

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

Aplicación galénica del modelo experimental reversible de síndrome de malabsorción oral generado por ebulina-f

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Arranz Paraíso

Directores

Manuel Córdoba Díaz

Jesús Tejero del Río

Damián Córdoba Díaz

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

APLICACIÓN GALÉNICA DEL MODELO EXPERIMENTAL REVERSIBLE DE SÍNDROME DE MALABSORCIÓN ORAL GENERADO POR EBULINA-F

PRESENTADA POR

DANIEL ARRANZ PARAÍSO

**Bajo la dirección de los doctores
Damián Córdoba Díaz, Manuel Córdoba Díaz y Jesús Tejero del Río**

Madrid, 2015



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

**Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica**

TESIS DOCTORAL

**“Aplicación galénica del modelo experimental
reversible de síndrome de malabsorción oral
generado por ebulina-f”**

Presentada por Daniel Arranz Paraíso para optar al grado de
Doctor

Dirigida por: D. Manuel Córdoba Díaz, D. Jesús Tejero del Río y
D. Damián Córdoba Díaz

Daniel Arranz Paraíso

2015

D. Manuel Córdoba Díaz, Profesor Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, D. Damián Córdoba Díaz, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y D. Jesús Tejero del Río, Profesor Asociado de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, directores de esta Tesis Doctoral certifican que el trabajo realizado por D. Daniel Arranz Paraíso puede ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 11 de Enero de 2015

Fdo.: Manuel Córdoba Díaz.

Fdo.: Damián Córdoba Díaz.

Fdo.: Jesús Tejero del Río.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a los directores de la tesis los profesores Manuel Córdoba Díaz, Jesús Tejero del Río y Damián Córdoba Díaz, todo lo que me han enseñado, su apoyo y su ayuda constante y al Prof. Girbés por permitirme hacer una estancia en su laboratorio para formarme en las técnicas de obtención y purificación de la ebulina-f y por su apoyo constante en todo momento.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense y del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, muy en especial a Joseba.

Muchas gracias a todos

A mi familia. En especial a mi madre y a mi hermana

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. LA VÍA ORAL COMO RUTA DE ADMINISTRACIÓN DE NUTRIENTES Y FÁRMACOS.	2
1.1.1. Aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos.	2
1.1.1.1. Boca y esófago	5
1.1.1.2. Estómago.	6
1.1.1.3. Intestino delgado.	9
1.1.1.4. Intestino grueso, recto y ano.	17
1.1.2. Patologías que cursan con síndrome de malabsorción oral.	18
1.1.2.1. Acciones de microorganismos o parásitos.	18
1.1.2.2. Déficits enzimáticos.	21
1.1.2.3. Defectos estructurales u orgánicos.	23
1.1.2.4. Otras causas del síndrome.	26
1.1.3. Modelos para estudiar la absorción de fármacos en dichas patologías.	26
1.1.3.1. Modelos espontáneos.	26
1.1.3.2. Modelos inducidos.	27
1.2. <i>SAMBUCUS EBULUS</i> . DESCRIPCIÓN, BREVE RESEÑA HISTÓRICA, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS.	31
1.2.1. Descripción.	31
1.2.2. Breve reseña histórica.	32
1.2.3. Composición.	33
1.2.4. Aplicaciones terapéuticas.	34
1.3. PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS DE <i>S. EBULUS</i> L.	35

1.3.1.	Etapas de la biosíntesis de proteínas afectada por la ebulina.	37
1.3.2.	Mecanismo de acción molecular de la ebulina.	39
1.3.3.	Variación estacional de las lectinas del <i>Sambucus ebulus</i> L.	40
1.3.4.	Tránsito intracelular de las RILs de <i>S. ebulus</i> L.	41
1.3.5.	Utilización de la ebulina en la construcción de conjugados.	44
1.3.6.	Inmunotoxinas antivasculares contra los tumores.	45
1.3.7.	Modelo de daño generacional intestinal de lectinas de <i>Sambucus</i>.	48
1.4.	CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS, FÍSICOQUÍMICAS Y MECANISMO DE ABSORCIÓN DE LA VITAMINA C.	54
1.5.	CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS, FÍSICOQUÍMICAS Y MECANISMO DE ABSORCIÓN DE LA GLUCOSA.	57
<hr/>		
2.	OBJETIVOS.	60
<hr/>		
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.	62
3.1.	MATERIAL DE LABORATORIO.	63
3.1.1.	Equipos.	63
3.1.2.	Material fungible.	64
3.1.3.	Reactivos químicos.	65
3.1.4.	Materiales biológicos.	67
3.1.4.1.	Animales de laboratorio.	67
3.1.4.2.	Material vegetal.	68
3.2.	MÉTODOS.	69
3.2.1.	Obtención de ebulina-f.	69
3.2.1.1.	Extracto crudo.	69
3.2.1.2.	Cromatografía de afinidad.	70

3.2.1.3.	Cromatografía de exclusión molecular.	72
3.2.1.4.	Caracterización de la ebulina-f obtenida.	74
3.2.2.	Administración intraperitoneal de dosis subletales de ebulina-f.	76
3.2.2.1.	Determinación de dosis subletales.	76
3.2.2.2.	Evolución del peso del animal respecto al tiempo.	78
3.2.2.3	Permeabilidad vascular.	78
3.2.3.	Influencia de la administración intraperitoneal de dosis subletales de ebulina-f en la cinética de absorción oral de vitamina C.	81
3.2.3.1.	Protocolo de estudio.	81
3.2.3.2.	Puesta a punto y validación de la metodología analítica (HPLC)	82
3.2.3.3.	Ajuste de la dosis oral a administrar y modificación de los perfiles de absorción.	90
3.2.3.4.	Ajuste de los datos y tratamiento farmacocinético de los mismos.	92
3.2.4.	Influencia de la administración IP de dosis subletales de ebulina-f en la cinética oral de glucosa.	97
3.2.4.1.	Protocolo de estudio.	97
3.2.4.2.	Técnica por glucometría y adecuación al protocolo.	98
3.2.4.3.	Ajuste de la dosis oral a administrar y modificación de los perfiles de absorción.	102
3.2.4.4.	Ajuste de los datos y tratamiento farmacocinético de los mismos.	103
3.2.5.	Análisis estadísticos de los resultados.	103
<hr/>		
4.	RESULTADOS.	108
4.1.	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EBULINA-F.	109
4.2.	ADMINISTRACIÓN IP DE EBULINA-F	115
4.2.1.	Determinación de dosis subletales.	115
4.2.2.	Evolución del peso del animal respecto al tiempo.	119
4.2.3.	Resultados del estudio de permeabilidad vascular	120

4.3.	INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN IP DE DOSIS SUBLETALES DE EBULINA-F EN LA ABSORCIÓN ORAL DE VITAMINA C.	125
4.3.1.	Puesta a punto y validación de la metodología analítica (HPLC)	125
4.3.1.1.	Resultados de la validación de la técnica analítica de HPLC.	127
4.3.2.	Determinación de los parámetros farmacocinéticos de absorción de vitamina C tras su administración oral en ratones.	142
4.3.3.	Evolución de los parámetros farmacocinéticos de absorción de vitamina C en ratones tratados previamente con dosis subletales de ebulina-f.	144
4.4.	INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN IP DE DOSIS SUBLETALES DE EBULINA-F EN LA ABSORCIÓN ORAL DE GLUCOSA.	149
4.4.1.	Determinación de los parámetros farmacocinéticos de absorción de glucosa tras su administración oral en ratones.	149
4.4.2.	Evolución de los parámetros farmacocinéticos de absorción de glucosa en ratones tratados previamente con dosis subletales de ebulina-f.	152
5.	DISCUSIÓN.	156
6.	CONCLUSIONES.	168
7.	BIBLIOGRAFÍA.	171
8.	RESUMEN (ABSTRACT).	183

1. INTRODUCCIÓN.



1.1. LA VÍA ORAL COMO RUTA DE ADMINISTRACIÓN DE NUTRIENTES Y FÁRMACOS.

1.1.1. Aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos.

La vía oral es la vía fisiológica de entrada de nutrientes y líquidos al organismo. Por ello, se emplea para tratar diversas afecciones del aparato intestinal, es decir buscando un efecto meramente local, o como principal vía para lograr una absorción sistémica y buscar un efecto farmacológico diferido respecto al lugar de absorción. Como dato a destacar indicar que los medicamentos comercializados que se administran por esta vía alcanzan un 85% del total de las presentaciones existentes. Por esta vía se administran principalmente tanto formas farmacéuticas sólidas (p.ej. pellets, comprimidos, granulados, cápsulas), como líquidas (p.ej. jarabes, suspensiones, infusiones).

Como justificación de lo expuesto anteriormente cabe destacar:

- La facilidad de administración: gracias a ser la vía fisiológica de absorción de líquidos y nutrientes posee una serie de mecanismos de absorción que permite que la mayor parte de los principios activos pasen al torrente sanguíneo.
- La amplia aceptación de la administración de medicamentos por esta vía: no se deben practicar o generar procesos dañinos o invasivos al paciente, a diferencia de otras vías como la intravenosa en la que se debe hacer una perforación en el organismo.
- El bajo coste de producción de la mayor parte de las formas farmacéuticas ya que por ejemplo no requieren esterilidad ni

eliminación de elementos pirógenos que si requieren las formas farmacéuticas parenterales.

- Por otra parte, es la vía de elección en tratamientos crónicos ya que además de no requerir de personal auxiliar especializado, el paciente controla su tratamiento.

A continuación se desarrolla la vía oral en las diferentes partes que presenta, indicando las características principales de las mismas. Además se indica las diferentes estrategias que se siguen para la administración de fármacos por esta vía.

A modo de resumen, en la tabla II aparecen las diferentes zonas del aparato digestivo y sus principales características respecto a longitud, las secreciones, el pH, el tiempo de retención del contenido y el área de absorción de cada sección del aparato digestivo:

Tabla II.- Características generales de la vía oral.

Secreción	Longitud	Secreción por día	pH	t de retención	Área de absorción (m²)
Boca	10 cm	Saliva (1-2 L)	5,0-8,5	10-20 s	0,02
Esófago	20 cm	Mucus	X	10-30 s	
Estomago	25 cm	Fluido gástrico	1,0-1,5	0,5-3 h	0,1-0,2
		Vacío (50-100 mL)			
		Con alimento (2-3 L)			
Duodeno	25-30 cm	Jugo pancreático (0,7-1,5 L)	7,5-8,4	6 a 8 h	100 (Mayor zona de absorción)
Yeyuno	2 m	Bilis (0,6 L)	6,1-6,8		
		Secreción mucosa (2-3 L)	6 a 7		
Íleo	3 m	Reabsorción agua		10 h (5-14 cm/h)	0,5-1
Colon	1,2-1,5 m	Reabsorción de agua (0,3-1 L)			
Recto	12-20 cm	Mucus rectal	7,2-7,4		0,04-0,07

1.1.1.1. Boca y esófago.

La boca constituye, dentro de la vía oral, una vía de administración de medicamentos poco utilizada en comparación con el resto del sistema digestivo. En la actualidad se están desarrollando diversas formas farmacéuticas capaces de liberar el fármaco en la cavidad bucal tanto para terapias locales como sistémicas. Esta doble posible estrategia de administración se da gracias a la diferente estructura de la mucosa y su grado de irrigación. Con estas dos características se consigue que los principios activos puedan penetrar al torrente sanguíneo (sin pasar por el hígado) o actuar sobre dolencias localizadas en la zona bucal.

Para la administración del medicamento, de manera genérica, se pretende que la forma farmacéutica transite a través de la boca de manera inalterada, si bien, puede verse afectado por un reflejo involuntario de masticación o por la acción de la saliva (Jiménez Torres, N. V. J. y cols., 1998). No obstante hay formas farmacéuticas que persiguen el propósito contrario como es el caso de los medicamentos masticables, chupables o bucodispersables.

La saliva es el líquido que se encarga de humectar la cavidad bucal y los alimentos, siendo éste el primer medio de ataque que se encuentran las formas farmacéuticas administradas por la vía oral. Su volumen y composición varía según las condiciones fisiológicas o patológicas así como el momento del día o los alimentos que se alberguen en su interior (Tortora, G. J. y Derrickson, B. (a); Ed 11ª; L. Nelson, D, 5ª; Ed.). Con respecto a su composición proteica, la saliva posee dos proteínas fundamentales, la ptialina y la mucina. La ptialina o amilasa salival es una enzima catalítica capaz de hidrolizar uniones glucosídicas de polisacáridos y por tanto implicada en la digestión de hidratos de carbono, liberación de

principios activos de ciertos medicamentos o la degradación de estos últimos. Por el contrario la mucina es una proteína humectante que no produce alteraciones sobre los alimentos o las formas farmacéuticas administradas.

El esófago por su parte, es un lugar de tránsito de la forma farmacéutica y del alimento (Jiménez, N. V. y cols.; 1998), actúa como nexo de unión entre la cavidad bucal (orofaringe) y el estómago (conectado por el cardias). Esto se debe a que no es una estructura de síntesis de enzimas o de absorción ni de nutrientes ni de fármacos, simplemente es un medio de transporte. El esófago se encuentra tapizado de mucus para facilitar el tránsito del bolo alimenticio o la forma farmacéutica en cuestión.

Por lo general, se considera que la liberación del fármaco en esta zona incrementa los efectos secundarios del mismo por los efectos indeseados locales. Estas liberaciones se suelen dar por mala praxis a la hora de administrar el medicamento que da lugar al alojamiento por un tiempo superior del esperado de la forma farmacéutica en la zona. Estos incrementos en el tiempo de alojamiento se suelen dar por no tomar el suficiente volumen de líquidos al administrar el fármaco, estar en posición de decúbito supino o presentar patologías que no permitan el libre paso de la forma farmacéutica.

1.1.1.2. Estómago.

Fisiológicamente, el estómago puede ser considerado como una zona de procesamiento de los alimentos para facilitar la obtención y absorción de nutrientes en las zonas gastrointestinales siguientes (intestino delgado e

intestino grueso). A pesar de ello sí que se absorben ciertos nutrientes, agua, ácidos grasos, alcohol y algunos fármacos de bajo peso molecular y de estructuras sencillas (p.ej. ácido acetil salicílico) (Jiménez, N. V. y cols.; 1998).

Para llevar a cabo el procesamiento de los alimentos o digestión, se han de considerar dos aspectos diferentes y complementarios, la digestión mecánica y la digestión química. El segundo tipo de digestión es la que de mayor manera afecta o puede afectar a los medicamentos administrados por esta vía, siendo el responsable de ella el jugo gástrico. Esta digestión química es el primer aspecto biofarmacéutico que se debe considerar a la hora de formular y administrar principios activos. El jugo gástrico está formado fundamentalmente por agua, sales inorgánicas (principalmente iones cloruros e hidronio) y enzimas (pepsinógeno y lipasa gástrica). Su pH oscila entre 1,0-2,0 aunque varía según las condiciones fisiológicas, los medicamentos y los alimentos o bebidas que se ingieran. El pH llega a alcanzar valores de 6,0 a 6,5 (Tortora y Derrickson, (b) Ed 11^a). Este medio tan agresivo puede afectar la solubilidad del fármaco, su capacidad de liberación desde el medicamento que lo vehiculiza, su estabilidad, así como dar efectos adversos, secundarios o indeseados derivados de las liberaciones o de las transformaciones que se dan en las estructuras moleculares de los principios activos.

El vaciamiento gástrico es un proceso variable y es otro parámetro biofarmacéutico a considerar. Así, cuanto mayor sea el tiempo de residencia, el principio activo tarda más en llegar al intestino donde se absorbe y aumentar sus posibilidades de alterarse o degradarse. La variabilidad deriva fundamentalmente porque los líquidos y los sólidos con un diámetro inferior a 2 milímetros (p.ej. pellets, polvos, microcápsulas, granulados) pueden pasar por el píloro a pesar de que éste se encuentre

contraído. Esto sucede por no estar completamente ocluído durante la digestión (W. Bunnett, N. (a); Ed: 5ª). Sin embargo, los sólidos de mayor tamaño (p.ej. comprimidos o cápsulas gastrorresistentes) no son capaces de pasar, por lo que se incrementa el tiempo tránsito en el estómago.

El tiempo de residencia también está controlado por la duración de las cuatro fases del vaciado:

- Fase I: se presenta como un periodo de quietud relativa. En este periodo se dan contracciones espaciadas que duran en total un periodo que va de treinta minutos a una hora. No es un periodo de digestión mecánica propiamente dicho, se indica como un proceso de premezclado de los componentes que entran por la vía oral.
- Fase II: se denomina como periodo de aceleración. En este momento se dan contracciones que van aumentando en intensidad y frecuencia. Es el inicio de la digestión mecánica que se realiza en este órgano. Esta fase junto con la tercera son las que pueden causar daños en las formas farmacéuticas administradas generando con ello efectos secundarios. En esta fase se da la salida de los elementos que tienen un diámetro inferior a 2 milímetros.
- Fase III: es un periodo de duración corta que se caracteriza por existir unas contracciones muy bruscas, intensas e irregulares. En este momento el estómago vacía todo lo que no se consiguiera reducir de un tamaño menor a los 2 milímetros.
- Fase IV: esta fase se denomina como periodo de motilidad decreciente. En este momento el estómago, en un tiempo de menos de 5 minutos, vuelve al estado basal de la fase I.

Terminando de esta forma un ciclo de digestión mecánica completo.

Las fases del vaciado gástrico se pueden modular por varios factores, sin olvidar las características intrínsecas de cada individuo (edad, sexo, ambiente). Se pueden destacar como factores de variación del vaciamiento gástrico: el consumo de líquidos o sólidos, la modulación intrínseca por receptores, la viscosidad del contenido gástrico, la presencia de partículas duras y el volumen del contenido gástrico.

1.1.1.3. Intestino delgado.

El intestino delgado tiene como misión prioritaria la absorción de los nutrientes derivados de los alimentos. Por otra parte y empleando los mecanismos de absorción de los nutrientes de los alimentos, también se encarga de la absorción de la mayoría de los fármacos de los medicamentos administrados por vía oral.

Es un órgano que comienza en el estómago y finaliza en el ciego (colon). Se pueden diferenciar tres partes: duodeno (considerada la zona de absorción principal de los principios activos, es la primera porción), yeyuno e íleon (Guyton, Arthur C. y Hall John, E. (a); Ed. 11ª; Tortora, G. J. y Derrickson, B. (c); Ed 11ª).

En cuanto a sus propiedades histológicas de interés biofarmacéutico, el intestino delgado posee un epitelio cilíndrico simple con varios tipos de células:

- Las células absortivas tienen la capacidad de absorber y digerir en su interior los nutrientes que llegan en el quilo.

- Las células caliciformes se encargan de secretar moco a la luz del intestino delgado. Este moco ayuda el tránsito de nutrientes a través del intestino por aumentar la fluidez del quimo.
- Epitelio glandular reviste las hendiduras que presenta la mucosa del intestino delgado. De este modo se constituyen las glándulas intestinales que también se conocen como criptas de Lieberkühn cuya función principal se centra en secretar el jugo intestinal.
- En este epitelio glandular hay también glándulas de tipo endocrino que son las células S, las CCK y las células K. Se encargan de secretar respectivamente la secretina, colecistocinina y el péptido insulinitrópico dependiente de glucosa.
- Las células de Paneth se encargan de secretar la lisozima. Este enzima es poco importante para las formas farmacéuticas a no ser que se utilicen glucosaminoglicanos en sus sistemas de cubierta.
- Los ganglios linfáticos solitarios (principalmente en íleon) y ganglios linfáticos agregados que forman las placas de Peyer (también en íleon).
- Glándulas de Brunner están en la zona submucosa del duodeno. Estas generan y secretan mucus alcalino que neutralizan el quimo ácido que procede del estómago transformándolo en quilo.

Una característica esencial que diferencia el intestino del resto del tubo digestivo es la presencia de los pliegues circulares, vellosidades intestinales y microvellosidades. La diana específica de las proteínas inactivadoras de proteínas (RIPs¹) no tóxicas tipo nigrina o ebulina, son las células madre secundarias del T.A.C. “*transit amplifying cells*” de las criptas intestinales tanto de intestino grueso como del intestino delgado

¹ En la actualidad, diversos grupos de investigación están introduciendo el término RIL “*ribosome inactivating lectins*” para referirse a las RIPs del sauco, por su doble naturaleza lectina y enzimática

(Gayoso y cols., 2005). Las T.A.C son células progenitoras que actúan como intermediarias en el paso de diferenciación desde la célula madre principal a las células diferenciadas que forman parte de las vellosidades intestinales. La muerte o daño de estas T.A.C (por ebulina o nigrina) no da un tejido afuncional irrecuperable ya que desde la célula madre principal pueden regenerarse las T.A.C que suplan las muertas o dañadas regenerando por tanto el tejido.

Las estructuras principales del intestino delgado (Figura I.1) son:

- Los pliegues circulares, que son invaginaciones de la mucosa y submucosa que presentan una longitud media de 10 mm de largo. Estos pliegues hacen que el quimo genere trayectorias circulares que facilitan el contacto con las paredes del intestino obligando a que todo el quimo entre en contacto con las paredes intestinales.
- Las vellosidades son proyecciones de la mucosa hacia la luz del intestino. Tienen una longitud que va de 0,5 a 1,0 mm de largo y están en una cantidad muy considerable (20-40 vellosidades por milímetro cuadrado).
- Las vellosidades se componen de epitelio de enterocitos, cimentados en una capa de lámina propia donde hay una arteriola, una vénula y un vaso quilífero (vaso linfático). Los nutrientes pasan a través de los enterocitos (efecto de primer paso intestinal) hacia el torrente sanguíneo o la linfa según el nutriente o principio activo que sea.
- Las microvellosidades son unas microproyecciones que presentan los enterocitos en la membrana apical (que se proyecta hacia la luz intestinal). Estas microvellosidades dan el aspecto de borde en cepillo de los enterocitos.

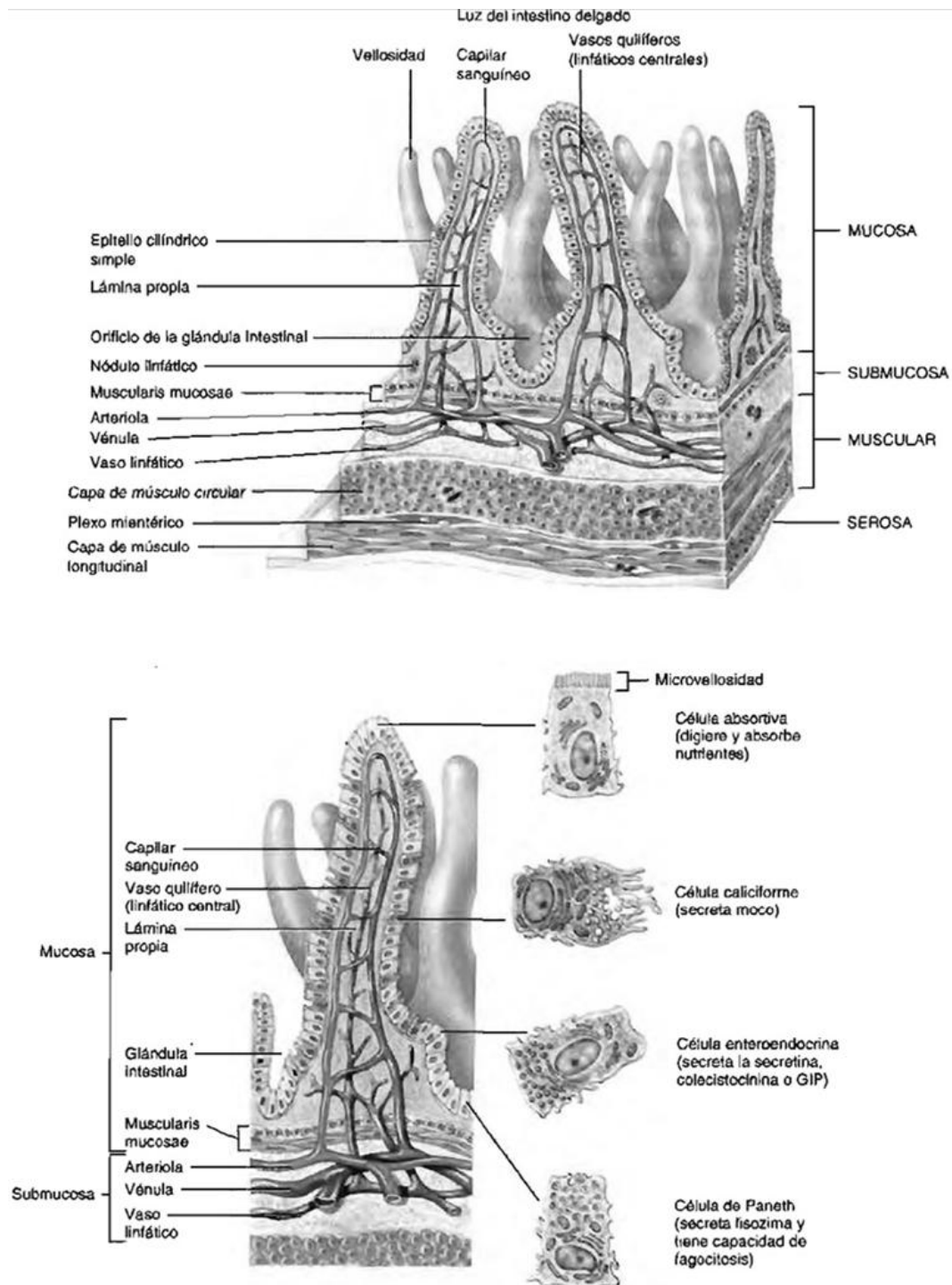


Figura I1.- Esquema de las estructuras microscópicas del intestino delgado. Adaptado de Tortora, G. J. y Derrickson, B. (Ed 11ª)

En estas estructuras se encuentran las enzimas necesarias para la digestión de diversos nutrientes antes de ser absorbidos. Como son: maltasas, sacarasas, lactasas, enteropeptidasas o proteasas y las nucleasas o nucleosidasas.

Tal y como se indicó anteriormente, en esta sección del tubo gastrointestinal se produce la mayor parte de la absorción de los principios activos y nutrientes, entendiendo por absorción el paso de las sustancias desde la luz del intestino a los enterocitos llegando al final al torrente sanguíneo o a la linfa. Se debe considerar que la mayor parte de los principios activos se absorben por dos vías:

- Transporte pasivo: la forma de paso por transporte pasivo se lleva a cabo por los principios activos que son capaces de absorberse pasando por difusión pasiva a través de las uniones intercelulares, por los canales de membrana o mediante difusión facilitada. En cualquier caso, el paso de moléculas se hace a favor de un gradiente de concentración.
- Transporte activo: esta modalidad requiere el uso de energía en forma de ATP y es la que usan la mayor parte de los principios activos. En este caso el paso de las moléculas se puede realizar en contra del gradiente, mediante receptores específicos y suele presentarse en unas zonas que se conocen como ventana de absorción. En estas zonas especializadas y específicas es donde se da la mayor absorción de los principios activos.

Las condiciones biofarmacéuticas que modulan la absorción son (Casabó, V. G. y cols., 1998):

- Tiempo de residencia en el intestino: es capaz de modificar la absorción de los nutrientes. Así en teoría, a mayor tiempo de residencia se produce, en un principio, una mayor absorción del principio activo. Sin embargo, se ha de considerar que un mayor tiempo de residencia aumenta el riesgo de procesos de degradación o modificación del principio activo derivado de la actuación de las enzimas propias del intestino o de la biota intestinal. El tiempo de residencia se ve afectado por la velocidad del tránsito intestinal que se ve modificado por los factores:
 - Volumen del contenido: actúa sobre la motilidad de forma antagónica al efecto que genera en el estómago. Así la presencia de un contenido intestinal elevado da una velocidad de vaciamiento mayor (menor tiempo de residencia) que si el contenido intestinal es menor (mayor tiempo de residencia). Por ello la administración de fármacos en ayunas genera efecto con mayor brevedad (vaciamiento gástrico en menor tiempo) y además hace que la absorción intestinal sea, en principio, mayor por el mayor tiempo de residencia en el interior del intestino.
 - Tonicidad: cuanta mayor actividad osmótica presente el contenido se genera una mayor tonicidad. Este efecto da un aumento del peristaltismo generando tiempos de residencia menores. El automatismo por distensión es la explicación para este comportamiento. Según esta teoría se indica que el músculo liso reacciona frente a las fuerzas que intentan

generar distensión en el mismo, siendo mayor la reacción del músculo cuanto más fuerza se aplica sobre él. Por tanto a mayor contenido intestinal, derivado de una alta osmolaridad del contenido, se induce una mayor fuerza de distensión contra el músculo liso. Frente a la fuerza de distensión se genera una reacción aumentando la contracción del intestino delgado y los movimientos peristálticos reduciendo el tiempo de residencia.

- Composición de la dieta: parece que solo modifica el proceso de segmentación no afectando en gran medida a la absorción de los principios activos.
- La viscosidad y consistencia: según los estudios que se han realizado, se observa una variación en la segmentación pero no en la velocidad de tránsito. A pesar de ello, cuanto mayor sea la viscosidad y consistencia del contenido intestinal, es menor la absorción de los principios activos por el efecto apantallamiento. Esto se puede justificar por no poder ponerse en contacto de forma eficaz los principios activos con las paredes absorbivas del intestino delgado.
- Efectos de primer paso: en este punto se engloban los efectos de modificación que afectan al fármaco cuando pasa a través de la capa de enterocitos del intestino (efecto de primer paso intestinal) y circula por el hígado (efecto de primer paso hepático).
 - Efecto de primer paso intestinal: han sido conocidas y descritas las biotransformaciones que se generan por las enzimas del retículo endoplasmático de las células absorbivas del intestino. Estas biotransformaciones son importantes en

ciertos principios activos por poder ser inactivados mediante las reacciones de las enzimas presentes en estas células.

- Efecto de primer paso hepático: todas las sustancias que se absorben en el intestino son drenadas por la vena porta que los conduce directamente al hígado. Una vez en el hígado, los principios activos pueden ser metabolizados por las enzimas de los hepatocitos o pueden ser secretados de forma alterada o inalterada por la bilis al interior del intestino pudiendo generar ciclos enterohepáticos.
- Ciclo enterohepático: se describe como la recirculación y reutilización que pueden sufrir ciertas sustancias (nutrientes o xenobióticos). Las moléculas tras ser absorbidas por el intestino llegan al hígado y desde éste se devuelven al interior del intestino vehiculizadas por las secreciones biliares. Estas moléculas que vuelven al interior del intestino pueden ser moléculas inalteradas (que no han sufrido el efecto de primer paso hepático o intestinal) o pueden ser moléculas metabolizadas (p.ej. glucuronidadas, sulfatadas, aminoacidadas). Las moléculas que han sido devueltas inalteradas se reabsorben por los enterocitos y retornan al hígado cerrando el ciclo. Sin embargo, las que han sido metabolizadas, para poder volver a ser reabsorbidas deben volver al estado nativo. Esta vuelta al estado nativo lo hacen posible las enzimas bacterianas presentes en el intestino, que liberan el nutriente o el xenobiótico posibilitando así la reabsorción del mismo llegando de nuevo al hígado por la circulación portal.

1.1.1.4. Intestino grueso, recto y ano.

El intestino grueso se ha considerado durante mucho tiempo como una zona en la que no se producían absorciones debido a que no posee estructuras absortivas especializadas. Tras diversos estudios se ha llegado a concluir que si se producen absorciones, pero dificultosas por el apantallamiento que genera el bolo fecal, por el elevado grosor de la capa mucosa y por la elevada concentración de flora bacteriana que puede degradar o modificar la estructura de los fármacos (Jiménez, N. V. y cols.; 1998).

Dentro de esta porción del aparato digestivo, la mejor zona de absorción podría ser la zona del recto por estar muy bien irrigada y con alta capacidad absortiva. Pero tiene por inconveniente que la absorción es errática; ya que si se absorbe el medicamento por las venas hemorroidales superiores pasa directamente a circulación sistémica sin sufrir efecto de primer paso hepático, mientras que si se absorben por las venas hemorroidales inferiores pasa el principio activo directamente a hígado sufriendo el efecto de primer paso.

Por todo lo descrito anteriormente, en la actualidad a pesar de los esfuerzos por lograr fármacos capaces de ser absorbidos en esta zona, la mayor parte de los medicamentos comercializados se emplean para el tratamiento local de enfermedades como la enfermedad del colon irritable.

1.1.2. Patologías que cursan con síndrome de malabsorción oral.

Las patologías que cursan por el síndrome de malabsorción oral se pueden clasificar según sus causas en los siguientes grupos:

1.1.2.1. Acciones de microorganismos o parásitos.

Estas enfermedades de naturaleza de malabsorción son producidas generalmente (salvo la excepción de la teniasis) por la desestructuración del tejido intestinal derivado de la presencia de microorganismos infecciosos o parásitos alojados en el interior del tubo gastrointestinal. Se debe indicar que todas las enfermedades que se incluyen en este apartado no son de tipo crónico y remiten o tienden a remitir cuando desaparece el agente causante de la misma. Se pueden clasificar en dos grupos:

- Parasitarias:
 - Anquilostomiasis: la infección se causa por la presencia del nematodo intestinal perteneciente a las especies *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*. Su distribución epidemiológica se da principalmente en las zonas tropicales y húmedas. La causa de la malabsorción se da por la desestructuración de las vellosidades intestinales, por donde succionan la sangre del huésped que les sirve de alimento (Botero, D. (a); Ed. 3°).
 - Estrongiloidiasis: el parásito causante es el *Strongyloides stercoralis*. En esta enfermedad se causan daños en todo el aparato digestivo pudiéndose generar duodenitis, colitis crónica leve, hemorragias digestivas, malabsorción derivada del elevado número de parásitos presentes en el intestino, íleo

paralítico, pancreatitis y colitis pseudomembranosa. Se genera una desestructuración muy grave a nivel intestinal con desestructuración profusa y graves problemas a nivel nutricional y orgánico al hospedador del parásito (Botero, D. (b); Ed. 3°).

- Teniasis: la *Taenia solium* y la *Taenia saginata* son las que generan en el ser humano esta enfermedad. En este caso la malabsorción no se genera por daño propiamente dicho del intestino delgado ya que el síndrome se genera por nutrirse el parásito de los alimentos que ingiere el hospedador. Ante la falta de llegada de nutrientes se desencadena el síndrome de malabsorción intestinal al sujeto (Botero, D. (c); Ed. 3°).
- Giardiasis: el agente etiológico de esta enfermedad es *Giardia intestinalis*. En este caso, la Giardia se encuentra localizada principalmente en el duodeno (aunque también se pueden encontrar a lo largo del resto del tubo digestivo) generando un cuadro clínico de malabsorción muy grave. En este síndrome se da un cuadro sintomático caracterizado por una diarrea lipídica sanguinolenta, cólico intestinal, dolor agudo y desestructuración casi total del interior del intestino delgado. El proceso de desestructuración se observa por la salida de lípidos en las heces de tipo esteatorreicas. Además por el contenido sanguinolento que indica la existencia de procesos de ulceración de la mucosa con perforación parcial o total del intestino (Botero, D. (d); Ed. 3°; Hernández-Sánchez, J. y cols; 2008; Bénére E. y cols; 2010).

- Microbiológicas:
 - Diarrea del viajero: el agente causal de este síndrome es *Vibrio cholerae*. Este tipo de síndrome de malabsorción no crónico. El síntoma que caracteriza a la enfermedad, y que causa la elevada mortalidad de la misma, es el elevado número de deposiciones que se estima entre 30 a 40 por día. Estas deposiciones son las causantes del síndrome de malabsorción ya que no permiten la absorción de nutrientes o fármacos por la alta velocidad de tránsito intestinal. Debido al alto número de deposiciones y a que no se da desestructuración en el tejido intestinal, son de tipo lechoso sin sangre ni esteatorrea. La enfermedad remite por si sola siempre que se mantenga hidratado al paciente y se puede tratarse con antibióticos (Madigan M. T. y Cols. (a); Ed: 10).
 - Tuberculosis intestinal: producida por la bacteria de la tuberculosis pulmonar la *Mycobacterium tuberculosis*. El cuadro clínico de esta enfermedad tiene por características principales los daños estructurales del intestino que pueden llegar a producir fístulas y peritonitis además de hiperplasia linfática con infiltrados de células epiteliales, mononucleares y células gigantes o de Langhans. Se dan deposiciones sanguinolentas y ligeramente esteatorreicas (Madigan M. T. y Cols., (b); Ed: 10).

1.1.2.2. Déficits enzimáticos.

Este tipo de enfermedades de malabsorción son causadas por los déficits o problemas estructurales en las enzimas secretadas por el intestino o en las existentes en el borde en cepillo del intestino, y generan síndromes que se suelen manifestar cuando se consume el nutriente que no es capaz el organismo de digerir.

- Intolerancia a la fructosa: la fructosa es un monosacárido muy presente en los vegetales, tanto en forma libre como formando grandes cadenas de inulina. Esta presenta una estructura de hexosa con formula química $C_6H_{12}O_6$. Y se ha empleado ampliamente como edulcorante en diabéticos para no dar picos de glucosa tras la ingesta (Bender, D.A., 1999). La intolerancia a la fructosa se detecta desde edades tempranas, cuando al dar a los bebés las papillas de frutas se ve que las rechazan o que no les sientan bien. Al final se generan los síntomas típicos de malabsorción como son la diarrea, los gases, el dolor intestinal o la distensión abdominal. El tratamiento de la enfermedad consiste en no ingerir alimentos con fructosa o al menos que no tengan un contenido en fructosa elevado.
- Disacaridasas: la enfermedad se genera por problemas genéticos (crónicas, primarias e irreversibles) o adquiridos (temporales, secundarias y reversibles) en la enzima afectada (sacarasa, lactasa, isomaltasa, trehalasa y maltasa) generando los diferentes tipos de intolerancias:
 - Intolerancia a la lactosa: la intolerancia a la lactosa se da tanto de manera primaria como secundaria.

- ✓ Intolerancia primaria o crónica o irreversible es un fenómeno fisiológico que se genera en la mayor parte de los animales mamíferos. En el caso de la especie humana se dan variabilidades según la edad y la región de procedencia de la persona en cuestión. Por ejemplo los orientales tienen una mayor prevalencia de intolerancia a la lactosa respecto a los occidentales (L.Nelson, D. y cols.; 3ª Ed.; W. Bunnett, N. (a); Ed: 5ª). Estas diferencias derivan de la propia evolución humana y de la diferente adaptación al entorno. Debiendo tener en cuenta que el proceso de adaptación fue fundamental ya que los alimentos ricos en lactosa (leche y derivados) son alimentos muy completos y de alto valor nutricional.
- ✓ Intolerancia secundaria o adquirida o reversible se genera por fenómenos transitorios como infecciones microbianas, medicamentos como los antiinflamatorios no esteroideos, fibrosis quística, síndrome carcinoide o gastropatía diabética. Los síntomas que se generan son muy parecidos a los que se producen por el resto de disacaridoses. En este caso, destacan los cólicos abdominales, la diarrea, distensión abdominal, flatulencia, disminución del pH en la zona por aumento de la fermentación bacteriana o aumento de biota bacteriana de naturaleza acidófila, entre otros.
- Intolerancia a la sacarosa: su estructura es de disacárido formado por la unión de un monómero de glucosa y otro monómero de fructosa (L.Nelson, D. y cols.; 3ª Ed; W. Bunnett, N, (b) Ed: 5ª). La enfermedad cursa de manera similar a la intolerancia a la lactosa, que se ha desarrollado anteriormente. Posee sus mismos síntomas; como son la

distensión abdominal, flatulencias, cólico abdominal, entre otros. La diferencia es la enzima afectada que impide la rotura del enlace o-glucosídico de la estructura disacarídica no permitiendo de esta manera la absorción de la sacarosa como monómeros de glucosa y de fructosa.

- Intolerancia a la maltosa (L.Nelson, D. y cols.; 3ª Ed.): la maltosa es un disacárido de glucosa que se extrae de la malta, es también conocido como el azúcar de la malta. Se producen cuadros clínicos parecidos a los que dan las intolerancias a la sacarosa y a la fructosa. La diferencia es la enzima afectada y el enlace glucosídico que no se hidroliza que es diferente a los anteriores.

1.1.2.3. Defectos estructurales u orgánicos.

Las enfermedades causadas por defectos orgánicos o por efectos estructurales se producen por diversas anomalías que generan daños intrínsecos al intestino, que imposibilitan la normal absorción de nutrientes y fármacos.

- Enfermedad celíaca: enfermedad causada por procesos autoinmunes, que se pueden desarrollar a lo largo de toda la vida, localizados principalmente en la zona del yeyuno. La enfermedad, se puede presentar en cualquier etapa de la vida, y aunque se suele diagnosticar con una mayor frecuencia durante el periodo de la infancia, en países desarrollados se diagnostica cada vez más en adultos. Como patogenia de la enfermedad hay que indicar que suele ser de mayor prevalencia en personas de piel blanca y que se suele

desencadenar con más frecuencia en climas tropicales. Para que se desarrolle la enfermedad se considera que es preciso que exista una predisposición genética y un desencadenante ambiental. Como iniciadores o desencadenantes de la enfermedad se tienen en consideración en el caso de las mujeres el primer parto y en los hombres cualquier intervención quirúrgica abdominal. A pesar de lo expuesto, es una enfermedad de origen genético pero no hereditaria ya que si no se presenta el estímulo desencadenante no se produce la enfermedad. Sin embargo, el hecho de que una persona padezca la enfermedad hace que aumenten las probabilidades de que sus familiares la padezcan, en comparación a la población en general. El agente que desencadena la enfermedad y sus síntomas es la gliadina. Esta es una de las proteínas que forman el gluten de algunos cereales (p.ej. trigo, cebada, centeno). Cuando contacta con el intestino del paciente enfermo genera un síndrome en el que participan los linfocitos T de forma mayoritaria, que origina una alergia mediada por IgE. Entre los síntomas destacan la dermatitis herpetiforme, distensión abdominal, esteatorrea, dolor abdominal recurrente, vómitos, diarrea, y pérdidas de las vellosidades intestinales (Guyton, Arthur C. y Hall John E (b), Ed. 11ª). El único tratamiento actual para combatir la enfermedad consiste en la eliminación total y absoluta de la dieta del gluten para que no se den las reacciones de hipersensibilidad intestinales.

- Enfermedad de Crohn: es una enfermedad de origen idiopático, es decir, no se conoce el origen que genera la enfermedad. Se cree que puede estar causada en parte por un componente autoinmune adquirido, aunque se considera también la intervención de factores genéticos o del ambiente. La sintomatología depende de donde esté

localizada la zona de inflamación, estas pueden estar localizadas por todo el intestino delgado, intestino grueso e incluso afectando al estómago. Dependiendo de cuáles sean las zonas afectadas se diferencia entre ileocolitis (afecta a íleon e intestino grueso), enteritis de Crohn (intestino delgado en general), ileitis (afecta al íleon), enfermedad de Crohn gastroduodenal (se da en el estómago y duodeno) y yeyunoileitis (genera parches de inflamación desiguales entre las zonas del yeyuno y del íleon). Se puede describir como sintomatología generalizada con diarrea, dolor abdominal, vómitos y síndrome de malabsorción.

Hay que destacar que en esta enfermedad no hay ningún agente etiológico que cause la enfermedad, por tanto no se puede eliminar la causa de la enfermedad con cambios de dieta o de hábitos del paciente. En esta ocasión se deben de utilizar tratamiento farmacológico que por el momento son únicamente paliativos, es decir, no son capaces de curar la enfermedad, solo puede eliminar las molestias y evitar los síntomas que se generan. Entre los tratamientos farmacológicos actuales están los medicamentos de la familia del 5-Amino Salicilato (5-ASA), inmunosupresores, glucocorticoides o terapia biológica como el Adalimumab o el Infliximab. También hay tratamientos quirúrgicos por extirpación de la zona que se encuentra dañada en el intestino, aunque estos últimos no son totalmente eficaces ya que puede surgir la enfermedad en otra zona del aparato digestivo (W. Bunnett, N, (c) Ed: 5ª).

1.1.2.4. Otras causas del síndrome.

En este grupo de causas del síndrome se engloban las causadas por problemas derivados de resecciones gástricas o intestinales. También, otras enfermedades cuyo origen se da por deformaciones en el propio intestino son por ejemplo las diverticulitis, estenosis o fístulas. En otro grupo se pueden indicar las causadas por la infiltración celular como son los linfomas, la gastroenteropatía eosinofílica o la amiloidosis. Por último citar enfermedades sistémicas que causan o pueden causar de una u otra forma síndrome de malabsorción como son: hipertiroidismo, enfermedad de Addison, hiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo, hipotiroidismo, síndrome carcinoide o la diabetes mellitus.

1.1.3. Modelos para estudiar la absorción de fármacos en dichas patologías.

Los animales modelo que se emplean actualmente en la investigación se pueden diferenciar en modelos espontáneos y modelos inducidos.

1.1.3.1. Modelos espontáneos.

Se puede plantear como ejemplo el Titi de cabeza de algodón (Mañé J.; 2007; Sayer, A. M; 1981; Bénéré, E.; 2010). Este animal es originario de las selvas de las zonas sudamericanas de Colombia, Panamá y Costa Rica.

Los animales criados en cautividad y en climas cálidos generan desde el segundo año de vida una colitis de naturaleza espontánea. La colitis se desarrolla hasta tal punto que cuando los animales envejecen se

da una elevada incidencia de adenocarcinoma de colon. La enfermedad cursa con una inflamación que se extiende por todo el colon de tipo crónico con superposición de estados agudos. La estructura microscópica intestinal que se genera es de infiltrados de neutrófilos, abscesos de cripta, depleción de mucina y generación de úlcera.

La enfermedad se caracteriza por tener un origen es desconocido y puede ser una mezcla de genes y de agentes ambientales.

Este modelo es irreversible y muy costoso por los propios gastos de adquisición como por las licencias de manipulación. Además hay que considerar que es un animal especial protección por ser un animal que se encuentra en vías de extinción.

1.1.3.2. Modelos inducidos

Estos modelos se pueden generar de forma exógena o por manipulación genética.

- Agentes exógenos: En este grupo se incluyen los modelos generados por el investigador sobre un animal sano y que no tiene mutaciones genéticas inducidas para buscar la generación de modelos inducidos. Estos solo pueden usarse para el estudio del mecanismo de la inflamación y no de la enfermedad al completo, por no haber inflamación intestinal recurrente. Los modelos producidos por agentes exógenos se pueden agrupar según la vía de administración (Aceituno, M. y Panés, J.; 2005).
 - Vía rectal: en este grupo están incluidos los procedimientos que se generan por vía rectal o mediante la infiltración directa

en el colon. Para la generación de estos modelos se suele generar una ligadura previa de colon y recto para limitar la zona de ataque del agente externo. En estos modelos se dan colitis difusa por contacto, producida por la irritación del intestino y por tanto únicamente pueden usarse para el estudio del mecanismo de la inflamación y no de la enfermedad al completo, por no haber inflamación intestinal recurrente. Entre otros agentes se utilizan el ácido acético, colitis por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), formol/inmunocomplejos y la oxazolona.

- Vía oral: se generan modelos animales con daños variables, según el agente empleado y las características del animal. Se usan principalmente como agentes: antiinflamatorios no esteroideos (el daño varía según el tiempo de residencia del fármaco en el aparato digestivo del animal y genera úlceras puntiformes yeyunoileales; abscesos y perforaciones a las 72 horas tras el inicio de la administración), carragenina (generan según la concentración úlceras sangrantes con cambios en la biota intestinal y formaciones pseudopolipoideas) y por dextrano sódico (tiene el mismo mecanismo que la carragenina pero va variando según el número de ciclos que administre).
- Vía subcutánea: se emplea como agente farmacológico la ciclosporina A. Para la generación del modelo se hace un trasplante la médula ósea a animales irradiados con el fin de eliminar la medula del animal receptor. Tras el trasplante se tratan durante 6 semanas con ciclosporina. Se elimina el tratamiento de ciclosporina y a las 2 semanas se hace el modelo que dura unos 30 días hasta resolverse por completo.

- Modelos inducidos por manipulación genética: Estos modelos han sido desarrollados fundamentalmente para determinar los genes implicados en este tipo de enfermedades.
 - Deficiencia de interleucina-12: en este modelo se genera un desarrollo normal y adecuado del animal hasta la cuarta semana de vida. A partir de la cuarta semana el animal genera una anemia severa que causa la mortalidad de la mitad de la camada. Los que sobreviven, a la semana décima tienen una pancolitis con diarrea, rectorragia y prolapso rectal. Se engrosa el intestino y se distorsionan las criptas, aunque el intestino delgado no se modifica (Aceituno, M. y Panés, J.; 2005).
 - Deficiencia de interleucina-10: este modelo induce daños por todo el tracto intestinal, aunque se afectan más el duodeno, yeyuno y colon proximal. Pueden aparecer hiperplasias de criptas, lámina propia y submucosa infiltrada por células plasmáticas, macrófagos, neutrófilos y células gigantes multinucleares (Aceituno, M. y Panés, J.; 2005).
 - Modelos transgénicos múltiples: los animales se manipulan para que presenten mutaciones a nivel de la interleucina-7, la proteína STAT4 y del HLA-B27. Estas modificaciones dan modelos animales similares a los que se causan por deficiencias de interleucina-10 e interleucina-12. En este modelo se producen daños por inflamaciones, infiltraciones y ulceraciones (Aceituno, M. y Panés, J.; 2005).
 - Ratones de la cepa CH3/HeJBlr: estos ratones desarrollan una colitis a la altura del ciego y el colon ascendente. La

enfermedad se genera sobre la semana tercera a cuarta de vida que se resuelve cuando el ratón llega a la décima o doceava semana de vida. Hay que decir que se pueden generar otras colitis o complementar las que se generan por este modelo empleando agentes como el TNBS (ácido trinitrobencenosulfónico) y el DSS (dextrano sódico). A nivel histológico se ven inflamaciones crónicas y agudas con ulceraciones, regeneración epitelial y abscesos de cripta. Por otra parte, se observa que hay una respuesta de linfocitos T del tipo Th1, que cursa con un aumento de interleucina-12 y de interferón gamma. Como ventaja de estos modelos se puede recalcar la inflamación espontánea. Pero como inconvenientes está el desconocimiento de la patogenia de las lesiones (Mañé, J.; 2007).

- SAMP/Ylt: en esta especie de ratones modificados se genera un modelo de ileitis en la vigésima semana de vida. La patología cursa como una ileitis de Crohn humana con inflamaciones, granulomas y alteraciones en la arquitectura epitelial. Otra característica que se genera en este modelo es la presencia de interleucina-12, interferón gamma y el factor de necrosis tumoral. Además, diversos estudios indican que se pueden tratar estos modelos con anti-ICAM-1 y anti-VCAM-1 (Aceituno, M. y Panés, J.; 2005). En este modelo la ileítis no se cura y se agrava hasta la semana octogésima. Esto ofrece la posibilidad de realizar estudios genéticos que permitan conocer los puntos de susceptibilidad que están involucrados en el origen de la enfermedad.

1.2. *SAMBUCUS EBULUS* L. DESCRIPCIÓN, BREVE RESEÑA HISTÓRICA, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS.

1.2.1. Descripción.

Sambucus ebulus L. (Figura I.2), cuyo nombre común es yezgo o saúco enano, es una planta perenne nativa de la División de las *Magnoliófitas*, Clase *Magnoliopsidas*, del Orden de las *Dipsacales*, de la Familia de las *Adoxaceae* y del Género *Sambucus*.



Figura I2. *Sambucus ebulus* L. Flores, hojas, frutos verdes y frutos maduros.

S. ebulus L. crece alrededor de 60 a 200 cm de altura, por lo general los tallos no están ramificados, tienen un amplio rizoma. Las hojas son opuestas, pinnadas, de 15 a 30 cm de largo, 5-9 cm de anchura y finamente

dentadas y lobuladas. Los tallos terminan en un corimbo (inflorescencia en la que el eje es corto y los pedicelos de las flores son largos y salen a diferentes alturas del eje). Todas las flores del corimbo abren a un mismo nivel, el tamaño es de 10 - 15 cm de diámetro con numerosas flores blancas (a veces color rosa). El fruto es una pequeña baya de color negro brillante que tiene entre 5 - 6 mm de diámetro. Las flores de *S. ebulus* L. aparecen en julio y agosto, sus semillas maduran entre agosto y septiembre y desaparecen en invierno.

1.2.2. Breve reseña histórica.

El análisis de los conjuntos arqueobotánicos recuperados en las excavaciones recientes en los Alpes del norte de Francia en "Le Chenet des Pierres" en Bozel (Savoie, Francia, 1.000 m sobre el nivel del mar) han permitido conocer las plantas que se utilizaban probablemente como alimento en un contexto de montaña durante el Neolítico Medio (4500-3500 aC) (Martin y cols., 2008). El estudio revela la presencia de semillas de saúco negro (*Sambucus nigra* L.), de saúco rojo (*Sambucus racemosa* L) y yezgo (*Sambucus ebulus* L.) (Martin y cols., 2008; Rottoli y cols., 2009).

Hipócrates y Dioscórides describieron en sus tratados al saúco como una importante planta de uso medicinal. En Europa está documentado el uso del saúco como planta medicinal desde muy antiguo, en el siglo XII se escribió "The Physicians of the Myddavai", tratado que recoge los conocimientos tradicionales sobre las curas y remedios que se preparaban a base de saúco en la zona de Gales desde del siglo VI. En 1651 el doctor alemán Blockwich publicó "Anatomía Sambuca", tratado escrito en latín en donde se recoge una serie de hasta 70 enfermedades que pueden ser tratadas con remedios preparados a base de saúco.

1.2.3. Composición.

Los compuestos fitoquímicos de *S. ebulus L.* más comúnmente conocidos son los flavonoides, esteroides, taninos, glucósidos, los derivados del ácido cafeico, y las lectinas de hojas, frutos y rizomas (Saeedi Saravi y cols., 2009a; Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007; Ghannadi y Ghassemi- Dehkordi., 1997; De Benito y cols., 1995; Yesilada., 1995; Pribela y cols., 1992). Los glucósidos cianogénicos *S*-sambunigrina y *R*-prunasina, así como la *R*-holocalina y la *S*-zierina se han aislado de *S. ebulus L.* y de los frutos se han aislado también *S*-sambunigrina y *S*-O- β -D-Glucopyranosil-mandelonitrilo). Las hojas y tallos contienen también *S*-sambunigrina (Buhrmester y cols., 2000; Jensen y Nielsen., 1973).

Las flores de *S. ebulus L.* contienen un 0,03 a 0,3% de un aceite esencial (aproximadamente el 0,01% de las bayas es aceite esencial) que contiene esencialmente ácidos grasos libres y un gran número de alcanos. El yezgo contiene proteínas con actividad antinutriente tales como lectinas y proteínas inactivadoras de ribosomas, estas últimas con actividad tóxica. Entre las lectinas sin actividad antirribosómica están SELIm, SELId de hojas, SELfd de frutos y SEAII en rizomas. Entre las lectinas con actividad antirribosómica están, ebulina I de hojas, ebulina-f de frutos y SEAI, ebulina r1 y ebulina r2 en rizomas entre otras (Girbés y cols., 1993a; Girbés y cols., 2004). El yezgo contiene también proteínas inactivadoras de ribosomas de una sola cadena denominadas ebulitinas (De Benito y cols., 1995).

1.2.4. Aplicaciones terapéuticas.

- Efecto antiinflamatorio. Las hojas de *S. ebulus L.* han sido funcionalmente utilizadas como un medicamento en el tratamiento de inflamaciones diversas (por ejemplo, dermatitis de contacto, picaduras de abeja y de ortiga, eczema, etc.) y hay varios informes que describen la influencia de los extractos *S. ebulus L.* en la inflamación (Ebrahimzadeh y cols., 2006, 2007; Saeedi Saravi y cols., 2009b)
- Efecto antibacteriano contra *Helicobacter pylori*. El papel de *Helicobacter pylori* en la patogénesis de la úlcera péptica ha sido bien establecido y utilizando tratamientos combinados de inhibidores de la bomba de protones (omeprazol) con antibióticos (ampicilina, amoxicilina, ofloxacina o tetraciclina) ha demostrado tener éxito en los pacientes afectados, con tasas de curación de hasta el 90% (Yesilada y cols., 1999; Korman y cols., 1997).
- Efectos bioquímicos y patológicos. Las hojas de *S. ebulus L.* poseen también actividad cicatrizante. Recientemente se ha aislado quercetin-3-O-glucosido que parece ser el responsable de dicha actividad (Süntar y cols., 2010). El estudio de extractos de metanol, n-hexano y de acetato de etilo de *S. ebulus L.* han demostrado efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos en ratones consistentes en apoptosis y necrosis de las células del parénquima hepático y la hipertrofia de las células de Kupffer (Ebrahimzadeh y cols., 2007).
- Efecto antioxidante. *S. ebulus L.* es particularmente rico en sustancias antioxidantes, en particular sustancias fenólicas simples como ácidos fenólicos y flavonoides, entre ellos los antocianos (Kiselova y cols., 2006). Aunque no se ha estudiado se cree que los frutos maduros son fuente de vitaminas en particular las

antioxidantes C y E. La capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos de *S. ebulus L.* se correlaciona muy bien con el contenido en polifenoles (Kiselova y cols., 2006 y Tesis Doctoral T. Girbés, 2009).

1.3. PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS DE *SAMBUCUS EBULUS L.*

Las proteínas inactivadoras de ribosomas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y se han descubierto también en otros reinos. Se caracterizan por presentar actividad inhibidora de biosíntesis de proteínas llevada a cabo por los ribosomas, de ahí su nombre (Girbés y cols., 2004). A pesar del gran número de trabajos sobre estas proteínas su papel en el organismo que la produce es todavía desconocido. Diversos autores (Peumans y Van Damme., 1995; Girbés y cols., 2004; Puri y cols., 2012; Stirpe., 2013) sugieren que estas proteínas forman parte del sistema de defensa de la planta frente a depredadores como insectos (Peumans y Van Damme., 1995), patógenos como virus (Girbés y cols., 1996) y hongos (Corrado y cols., 2005).

La clasificación actual de las RIPs las divide en dos categorías, las de tipo 1² y las de tipo 2 (Girbés y cols., 2004). Las de tipo 1 están formadas por una única cadena polipeptídica que es la que presenta la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas. Las de tipo 2 presentan dos cadenas polipeptídicas diferentes, una denominada cadena A que presenta la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas y que es equivalente a la cadena única de las RIPs de tipo 1, y una segunda cadena denominada B

² Las ebulitinas son RIPs tipo 1 aisladas de las hojas de *S. ebulus L.* y que fisiológicamente coexisten con RIPs tipo 2. Hasta la fecha se han aislado tres ebulitinas, la α , la β y la γ . El peso molecular de la isoforma α es de 32 kDa mientras que las β y γ son ligeramente más pequeñas (Mr 29 kDa).

que tiene propiedades de lectina. Las RIPs de tipo 2 pueden también estar formadas por dímeros unidos por fuerzas no covalentes, donde cada dímero es una molécula de dos cadenas polipeptídicas, equivalente cada una a una RIP de tipo 2.

Las RIPs de tipo 2 tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares debido a que reconocen y pueden unirse a los receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol (Girbés y cols., 2004; Girbés y cols., 2003), lo que hace que algunas de ellas como ricina, abrina, volkensina, viscumina y modeccina sean extremadamente tóxicas. Otras en cambio pueden ser mucho menos tóxicas que la ricina, como la ebulina y la nigrina (Girbés y cols., 2004), y por eso se las ha conocido como no tóxicas para células humanas cultivadas y para ratones de ensayo. Las RIPs de tipo 1 no reconocen a los receptores de membrana plasmática por lo que no pueden utilizarlos para atravesar la membrana y esto hace que sean menos tóxicas que las de tipo 2.

En la tabla I2 se muestran las lectinas de *S. ebulus L.* con actividad antirribosómica más estudiadas descubiertas hasta la fecha. La letra que acompaña al nombre hace referencia a la parte de la planta de donde se aísla la proteína. La ebulina l del *S. ebulus L.* y la nigrina b de *S. nigra* fueron las primeras lectinas antirribosómicas que se aislaron en la familia *Adoxaceae* (Girbés y cols., 1993a, b). La isoforma ebulina-f se aísla de frutos verdes de *S. ebulus L.*, aunque no se encuentra en los frutos maduros y es algo más activa sobre los ribosomas de lisados de reticulocito de conejo que la ebulina l y también más tóxica en células HeLa (Cítores y cols., 1996). Una de las mayores diferencias entre la familia de las lectinas antirribosómicas del saúco y la ricina es la baja toxicidad que tienen sobre células animales en cultivo y en los animales de experimentación, ratas y ratones (Girbés y cols., 1993a). Así tenemos que la IC₅₀ de ebulina l en

células HeLa es 64,3 nM (unas 60.000 veces superior que la IC_{50} de la ricina).

En la experimentación con animales, la dosis de administración intraperitoneal de ebulina-f a ratones es de 2-3 mg/kg de su peso corporal (Jiménez y cols., 2013a), mientras que para la ricina es de 8 µg/kg. La baja toxicidad de la ebulina con respecto a la ricina en células en cultivo podría deberse a las diferencias en sus cadenas B según se desprende de los estudios cinéticos y de transporte intracelular y la hace de especial interés en la síntesis de inmunotoxinas (Tesis Doctoral T. Girbés, 2009).

Tabla I2. Lectinas antirribosómicas de *Sambucus ebulus* L.

Tejido	Proteína	IC_{50}-lisado ret. conejo (nM)	<i>Mr</i> cadena A (KDa)	<i>Mr</i> cadena B (KDa)
Hojas	ebulin l	0,15	26	30
Frutos	ebulin f	0,03	30	34
Rizomas	SEA I	-----	67	67
Rizomas	ebulin r1	0,05	26	30
Rizomas	ebulin r2	0,04	26	30
Umbelas	ebulin blo	-----	28	35

1.3.1. Etapa de la biosíntesis de proteínas afectada por ebulina.

Las etapas que conforman el complejo proceso de la elongación de las cadenas polipeptídicas (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007; Youngman y Green, 2007; Wilson y Nierhaus, 2006) son:

- 1ª.- la fijación de aminoacil-ARNt al sitio ribosómico aceptor o sitio A, que se encuentra vacío al iniciar el ciclo de elongación.

2^a.- la formación del enlace peptídico entre el peptidil-ARNt presente en el sitio ribosómico donador, o sitio P, y el aminoacil-ARNt presente en el sitio ribosómico aceptor.

3^a.- la translocación del nuevo peptidil-ARNt formado desde el sitio A al sitio P, que continúa con la eyección del ARNt deacilado presente en el sitio P y el avance del ribosoma respecto al ARN mensajero en la longitud de un codón.

Para la fijación del aminoacil-ARNt se forma un complejo ternario con el factor de elongación 1 en los eucariontes y Tu en los procariontes, y GTP, con una estequiometría 1:1:1. Este proceso hidroliza el GTP a GDP y ortofosfato, utilizándose la energía liberada en la separación rápida de los factores de elongación (Girbés y cols., 1976; Girbés y cols., 1977). Cuando el peptidil-ARNt se encuentra en el sitio donador y el aminoacil-ARNt ocupa su lugar en el sitio aceptor, se completa la formación del enlace peptídico entre el peptidilo y el aminoácido formando un peptidil-ARNt que está situado en el sitio A y tiene un aminoácido más que el inicial.

Seguidamente se produce la translocación del peptidil-ARNt formado, favorecida por los factores de elongación 2 en los eucariontes y G en los procariontes, formando un complejo binario con GTP. Posteriormente a la translocación se completa la hidrólisis de GTP a GDP y ortofosfato, reacción que produce la energía utilizada en la liberación del ARNt deacilado que se encuentra en el sitio de salida del ARNt, o sitio E (Spiegel y cols., 2007) y de los factores de translocación 2 y G (Modolell y cols., 1975; Girbés y cols., 1976; Spiegel y cols., 2007). En conclusión, la interrupción en la síntesis de las proteínas está provocada por la depuración del ARNr que impide al ribosoma fijar los factores de elongación en la etapa de translocación de las cadenas polipeptídicas. Se ha

constatado también que las RIPs pueden actuar sobre ácidos nucleicos no ribosómicos (Nielsen y Boston, 2001; Barbieri y cols., 1997). Esto justifica la denominación de las RIPs como N-glucosidasas (Barbieri y cols., 1997).

1.3.2. Mecanismo de acción molecular de ebulina.

En 1987, casi un siglo después del descubrimiento de la ricina, se fijó y describió el proceso molecular por el que ejercen su efecto sobre el ribosoma de las células, la ricina y otras lectinas antirribosómicas, e incluso proteínas inactivadoras de ribosomas sin actividad lectina (Endo y Tsurugi., 1992). La toxina *Shiga* y la ricina ejercen como N-glucosidasas sobre el ARN mayor de los ribosomas de mamíferos y en otros casos en plantas, bacterias y hongos (Barbieri y cols., 1993; Stirpe y Battelli., 2006). En la figura I3 se muestra el esquema del mecanismo de acción de las lectinas antirribosómicas realizando una depurinación que consiste en la hidrólisis del ácido ribosómico mayor del ribosoma. Este mecanismo es similar en todos los sistemas mencionados anteriormente. La adenina eliminada es el centro de un bucle bien conservado a lo largo de la evolución, que muestra las secuencias nucleotídicas del ARNr mayor de diversas especies animales, vegetales y microbianas. Esta adenina eliminada por la acción de las proteínas antirribosómicas se encuentra junto a la posición de acción de ARNasas muy específicas de hongos, como son la α -sarcina de *Aspergillus giganteus*, y las restrictocina y mitogilina de *Aspergillus restrictus* (López-Otín y cols., 1984; Fando y cols., 1985). El resultado en estos casos es el mismo, la inhibición de la síntesis de proteínas de manera irreversible. Con otras proteínas como las inactivadoras de ribosomas SLT de *Escherichia coli*, ricina de *Ricinus communis* y ebulina de *S. ebulus* L. se produce el mismo efecto (Tesis Doctoral Girbés, 2009).

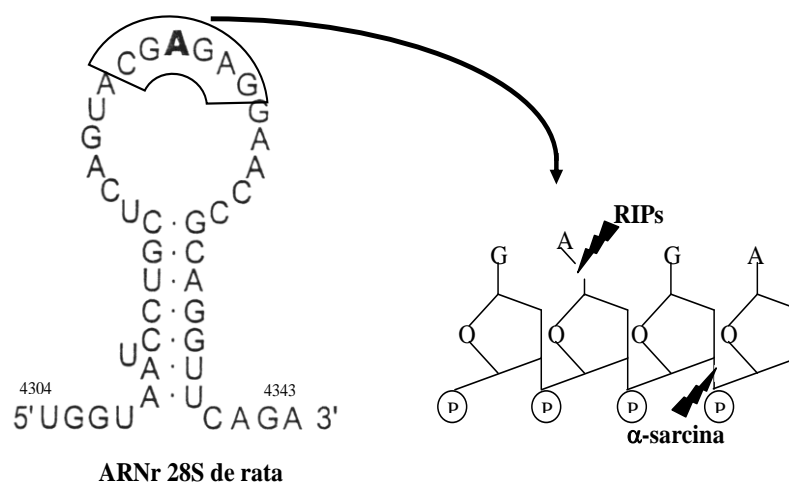


Figura I3. Secuencia de nucleótidos del bucle del ARNr responsable de la interacción del factor de elongación 2. La figura de la izquierda representa la estructura secundaria del ARNr 28S del ribosoma de rata donde las RIPs producen la eliminación de una adenina (señalada en negrita). La figura de la derecha muestra la posición de interacción de la ribonucleasa fúngica α -sarcina en la unión con la ribosa siguiente con el esqueleto de polifosfato del ARNr (Girbés y cols., 2004; Jiménez y cols. 2012b).

1.3.3. Variación estacional de las lectinas del *Sambucus ebulus L.*

De las hojas maduras de *S. ebulus L.* se aislaron ebulina I y la lectina dimérica relacionada denominada SELld (Girbés y cols., 1993b; Rojo y cols., 2003). La concentración de cada una de estas proteínas depende del estadio de desarrollo de las hojas, así la ebulina I que aparece en los brotes jóvenes y hojas maduras y progresivamente desaparece al pasar las hojas a estado senescente, por el contrario la SELld que inicialmente en los brotes y hojas jóvenes se encuentra en pequeñas concentraciones, al madurar las

hojas aumenta su concentración hasta ser prácticamente la única lectina que se encuentra en las hojas senescentes (Rojo y cols., 2003).



Figura I4. Detalle de ramas con hojas senescentes de *S. ebulus* L. recolectadas para el aislamiento de SELld

Por otro lado, la ebulina-f es una proteína inactivadora de ribosomas similar a ebulina l pero presente en los frutos de *S. ebulus* L. que tiene la capacidad de polimerizarse a diferencia de otras como la ebulina l de hojas que no lo hace, hecho este que sugiere una función de almacenamiento de proteína (Cítores y cols., 1993; 1996; 2013).

1.3.4. Tránsito intracelular de las RILs de *S. ebulus* L.

La diferencia funcional fundamental entre ebulina l y ricina está en la cadena B que es la responsable de la interacción de estas RIPs con los receptores de la membrana plasmática que permiten su internalización en el citosol (Svinth y cols., 1998; Pascal y cols., 2001). Los estudios de toxicidad

y de captación dependiente de la fase fluida de la cadena A aislada de la ricina muestran como ambos procesos son iguales a los que permiten la internalización de las RIPs monocatenarias sin actividad lectina (Svinth y cols., 1998). Las diferencias entre las cadenas B de la ricina y de la ebulina I son la causa de la falta de toxicidad de la ebulina, ya que disminuye en gran medida su afinidad por los galactósidos (Pascal y cols., 2001).

En la figura I5 se presenta un modelo del tráfico intracelular de la ebulina, la nigrina y la ricina.

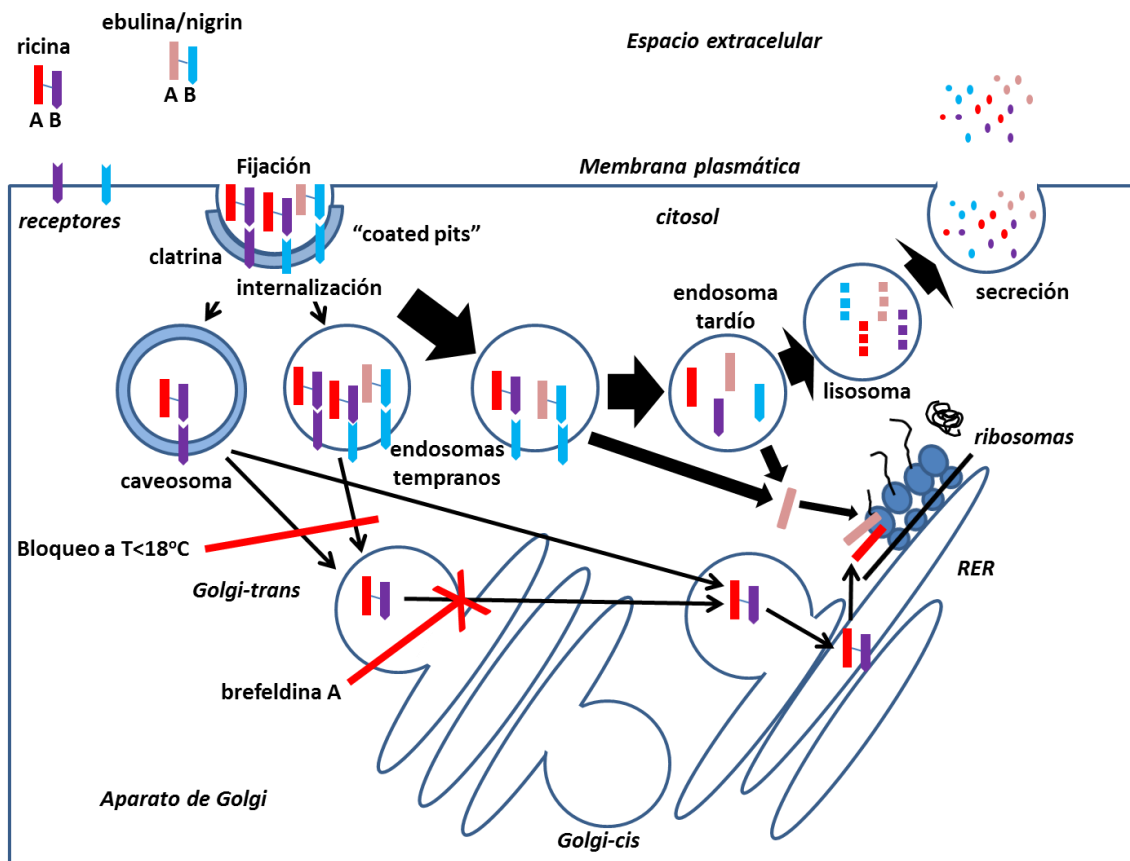


Figura I5. Rutas intracelulares seguidas por ebulina, nigrina y ricina. (Jiménez y cols., 2012b).

La ruta seguida por las moléculas de ricina para alcanzar el citosol de las células se inicia con su internalización mediante receptores de membrana y su integración en compartimentos endosómicos sensibles al NH_4Cl , seguidamente pasa por compartimentos sensibles a la temperatura que se bloquean a 18°C y finalmente la ricina es translocada en el aparato de Golgi, este proceso es sensible a la brefeldina A que es una droga que tiene un efecto desorganizador del aparato de Golgi (Battelli y cols., 1997). Solo unas pocas moléculas de ricina alcanzan el citosol a través del aparato de Golgi y son eficaces para inactivar los ribosomas, ya que la mayor parte de la ricina internalizada es degradada completamente en los lisosomas (Battelli y cols., 2005).

Aunque los estudios de internalización de las RIPs de *Sambucus* se han realizado con nigrina b (Battelli y cols., 2005), dada la similitud de nigrina b y ebulina I es muy probable que ambas, nigrina b y ebulina I, se internalizan aproximadamente de la misma manera. La ruta seguida por nigrina/ebulina es inicialmente la misma que la seguida por la ricina. Cuando ebulina se internaliza pasa por endosomas sensibles a NH_4Cl y continua por lisosomas donde se degrada en su mayor parte. Finalmente no logra alcanzar el aparato de Golgi.

Desde los endosomas, las rutas de nigrina/ebulina y ricina son diferentes ya que los efectos antirribosómicos de nigrina/ebulina que se producen a altas concentraciones son independientes de la temperatura e insensibles a la brefeldina A. En el caso concreto de nigrina b se ha visto que prácticamente todas las moléculas de lectina son transportadas desde los endosomas hasta los lisosomas donde son completamente degradadas (Battelli y cols., 2005). Con concentraciones 4 ó 5 veces superior en orden de magnitud a la ricina se llegan a acumular suficientes moléculas de nigrina/ebulina en los endosomas como para forzar su translocación

espontánea desde los endosomas hasta el citosol. La diferencia entre las rutas intracelulares seguidas por nigrina/ebulina y ricina puede estar en que los receptores de unión de ambas proteínas sobre la membrana plasmática, sean diferentes (Pascal y cols., 2001; Muñoz y cols., 2001).

Por otra parte, la diferente toxicidad de la ricina y la ebulina podría tener relación con el hecho de que la toxicidad de la ricina contribuya a una actividad lipasa inherente a las subunidades A-B localizada en un sitio conformado por residuos pertenecientes a las dos subunidades (Morlon-Guyot y cols., 2003). Esta actividad ayudaría a que algunas moléculas de ricina pudieran alcanzar el retículo endoplasmático más fácilmente y finalmente el citosol. La ausencia de este sitio con actividad lipasa en sus moléculas podría ser la causa de la baja toxicidad de las lectinas antirribosómicas no tóxicas (Morlon-Guyot y cols., 2003). Esta ausencia de actividad lipasa obligaría a nigrina/ebulina a continuar la ruta degradativa lisosómica inevitablemente (Tesis Doctoral Girbés, 2009).

1.3.5. Utilización de la ebulina en la construcción de conjugados.

Las lectinas y las proteínas inactivadoras de ribosomas de *S. ebulus L.* se han utilizado para la construcción de nuevos fármacos experimentales contra el cáncer. Entre ellos se encuentran las inmunotoxinas antivasculares construidas frente a uno de los receptores del TGF- β denominado CD105 o endoglina. Otros fármacos diana contruidos con proteínas de *S. ebulus L.* han sido los conjugados con transferrina activos sobre células tumorales que sobre expresan el receptor de transferrina.

1.3.6. Inmunotoxinas antivascuales contra los tumores.

El desarrollo del tumor se caracteriza por el establecimiento de una red vascular que abastece a la masa del tumor de oxígeno y nutrientes. La inducción de una red depende de factores proangiogénicos liberados por las células tumorales (Benítez y cols., 2005; Hanahan y Folkman., 1996; Folkman., 1995). El crecimiento de las células cancerosas en el tumor crea una presión positiva que impide la entrada de medicamentos. Esto hace que los tratamientos convencionales de quimioterapia reduzcan su eficacia y pierdan parte de su potencial terapéutico (Benítez y cols., 2005; Jain., 1990).

Uno de los avances en la terapia experimental contra los tumores consiste en la supresión de la formación de vasos del tumor (neovasculatura) que evitará el crecimiento de un gran número de células cancerosas (Folkman., 1995). Como se indica en la figura I6, la destrucción de la neovasculatura conlleva la destrucción parcial o total de la misma (Muñoz y cols., 2013). Estos fármacos experimentales están constituidos por dos partes, una parte conductora (anticuerpo monoclonal frente a la proteína blanco o una lectina) y una parte efectora tóxica (proteínas inactivadora de ribosomas de origen vegetal, quimioterápicos, isótopos radioactivos) que una vez identificado el blanco celular lo destruye. Las proteínas de *S. ebulus L.* se han utilizado en la construcción de conjugados e inmunotoxinas (Benítez y cols., 2005; Fracasso y cols., 2010; Cítores y cols., 2002; Tesis Doctoral Girbés, 2009).

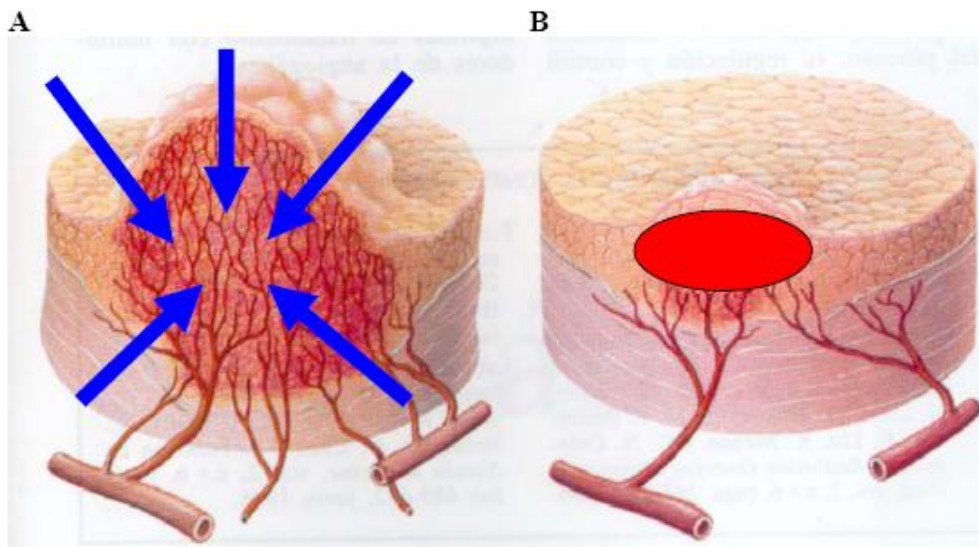


Figura I6. Ataque de la neovascularización tumoral con inmunotoxinas. El tumor presenta una fina capa capilar que nutre la masa tumoral con oxígeno y nutrientes (A). Las inmunotoxinas contra la neovascularización destruyen la red capilar y provocan el colapso del tumor (B). Girbés, 2009 (modificado de Folkman., 1996).

Muñoz y cols., 2013 han evaluado el efecto de la administración de la inmunotoxina MJ7-nigrina sobre tumores B16 de melanoma de ratón que son muy agresivos. La inyección de células de melanoma B16 promueve el desarrollo de un tumor palpable localizado en el punto de inyección. El tumor crece exponencialmente. La administración de anticuerpo MJ7 libre, o nigrina libre, no ejerce efecto importante sobre el crecimiento del tumor. Sin embargo, la administración de la inmunotoxina frena el crecimiento del tumor (Figura I7).

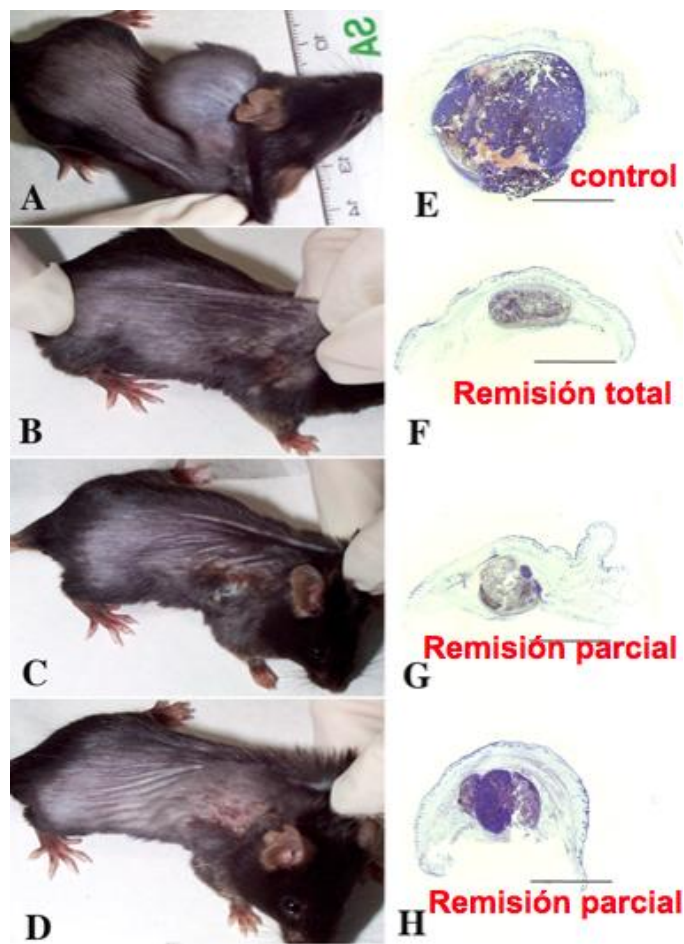


Figura I7. Aspecto externo (parte izquierda) e histología (parte derecha) de un ratón en el que se ha generado un melanoma experimental. (A y E) animal sin tratar, (B-D y F-H) animal tratado durante siete días con la inmunotoxina experimental. Barra de escala: 5mm (Muñoz y cols., 2013).

Las proteínas nigrina b de *S. nigra* y ebulina 1 de *S. ebulus L.* se han utilizado para la construcción de conjugados con transferrina humana que han demostrado ser activos frente a células cancerosas creando una ventana terapéutica que podría ser de utilidad en la terapia experimental del cáncer (Cítores y cols., 2002).

1.3.7. Modelo de daño-regeneración intestinal de lectinas de *Sambucus*.

Existen estudios en ratón, donde se generan síndromes de malabsorción basados en el uso de las lectinas de *Sambucus* (Gayoso, M. J. y cols., 2005; Jiménez, P. y cols., 2013a). En estos estudios se indica que los animales de experimentación pueden volver a regenerar los tejidos dañados pudiendo volver a ser individuos sanos sin alteración intestinal. De tal manera que se consigue un modelo de daño-regeneración que no ha existido hasta el momento sin hacer manipulaciones genéticas sobre los animales. Ello implica una disminución en los costes de investigación y un mejor acceso a los estudios por poder partir desde ratones de tipo Swiss blanco CD1.

Para realizar los modelos, tomando como primer ejemplo la nigrina-b, hay que considerar que la administración por vía intravenosa de dosis letales de 16 mg/kg de peso a ratones, posee un efecto similar a la producida por ricina a dosis de 8 µg/kg. Ello indica que a pesar de generar daños a nivel orgánico la nigrina-b presenta un rango de toxicidad menor al de la ricina. En un estudio publicado por Gayoso, M.J. y cols. en 2005, se incluyó un análisis histológico intestinal detallado realizado tras la administración intravenosa de dosis subletales de nigrina-b (5 mg/kg de peso corporal). A las 5 horas de la administración intravenosa de la dosis de nigrina-b estudiaron el tejido intestinal. Se observó que se induce una alteración en la mucosa intestinal que afecta en primera instancia a las criptas de Lieberkühn, sin graves alteraciones en las vellosidades. En el tercio medio de las criptas se observa un gran número de pequeñas células dañadas con aspecto apoptótico (contracción celular, condensación del contenido nuclear, aumento de eosinofilia y formación de cuerpos apoptóticos). Núcleos celulares marcados con fluoresceína demuestran que la muerte celular se genera por rotura de las cadenas de ADN mediante nucleasas endógenas celulares. Por otra parte en las criptas del control no

se encontraron las células apoptóticas por lo que se demostró que el daño es causado por la administración de nigrina-b. También se describieron daños leves en el intestino grueso y de la lámina propia.

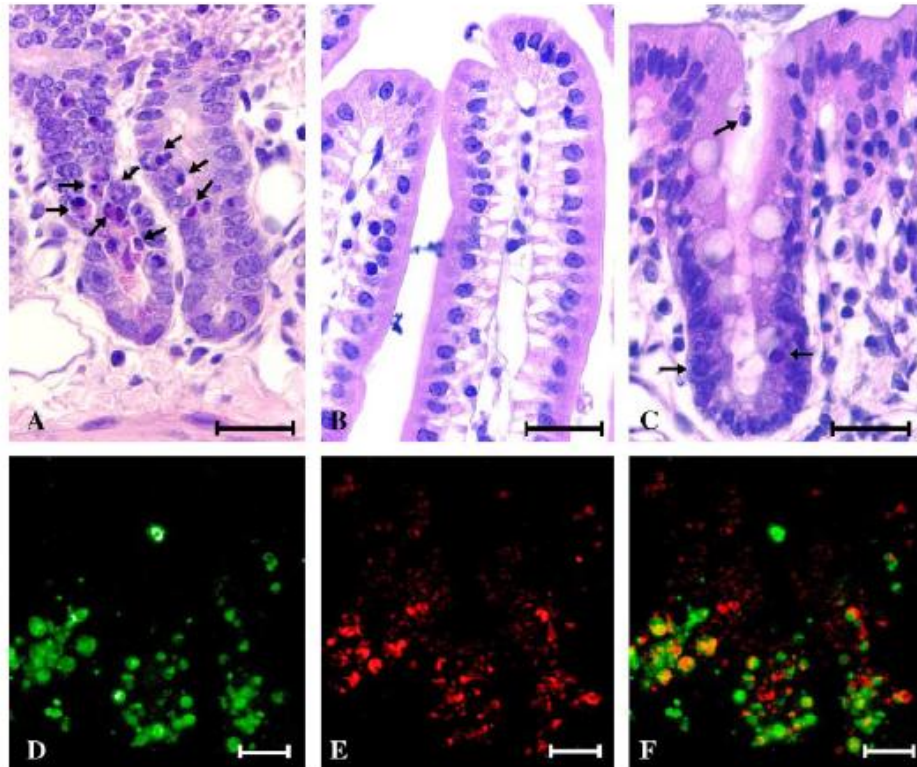


Figura I.8. Análisis histológico del tejido intestinal a las 5 horas tras el tratamiento con nigrina-b. Secciones histológicas de intestino delgado y grueso teñidas con hematoxilina-eosina (A, B, y C) y por el método de TUNEL (D, E, y F) 5 h después de la administración de 5 mg/kg de peso corporal de nigrina b. Las criptas del intestino delgado (A) muestran lesiones en las células principalmente en el tercio medio (flechas), mientras que el epitelio de las vellosidades no se ve afectado (B). En las criptas del intestino grueso, las células lesionadas se indican con flechas (C). Las células apoptóticas en las pequeñas criptas intestinales fueron marcadas con fluoresceína (D) y el yoduro de propidio que se utilizó como tinción nuclear general (E). La imagen resultante de la fusión se muestra en (F). Barra de escala = 25 μ m. (Gayoso y cols., 2005)

Este análisis se realizó también a las 24 h después de la administración de la misma dosis subletal de nigrina b de 5mg/kg.

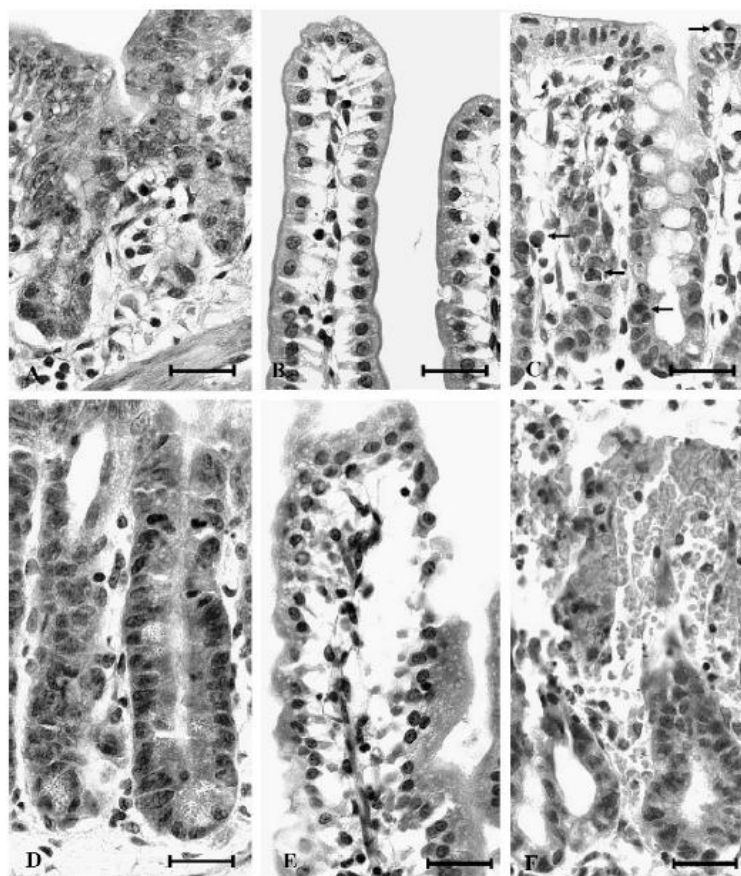


Figura I9. Análisis histológico del tejido intestinal a las 24 horas y 3 días tras el tratamiento con nigrina-b. Secciones histológicas de intestino delgado y grueso teñidas con hematoxilina-eosina durante 24 h (A, B, y C) y 3 días (D, E y F) después de la administración intravenosa de 5 mg/kg de nigrina-b. Tras 24 h, se atrofian las criptas intestinales (A), pero el epitelio de las vellosidades no muestra lesiones histológicas (B). Las grandes criptas intestinales (C) tenían algunas células apoptóticas (flechas). A los 3 días, las pequeñas criptas intestinales (D) recuperan su epitelio y presentan mitosis abundantes (D). Las vellosidades fueron perdiendo su epitelio y se recuperan en la base (E). El intestino grueso está muy dañado y la mayor parte de su epitelio ha desprendido (F). Barra de escala = 25 μ m. (Gayoso y cols., 2005)

Transcurrido este periodo de tiempo, los daños que se producen son mucho más importantes. En el intestino delgado se da un acortamiento muy acusado de las criptas que tienen aspecto atrofiado y se recubren con un tejido formado por una mezcla de células aplanadas y restos de células muertas. El ambiente histológico e histoquímico general de las glándulas y de la luz es de tipo apoptótico. Se describe también una ligera inflamación en la lámina propia con leve infiltración inflamatoria. Por último se indica que en el intestino grueso no se aprecian grandes cambios, persisten las células apoptóticas diseminadas que se alojan en las glándulas y en la luz intestinal.

A los tres días (Figura I.9) de la administración de la nigrina-b a dosis subletales (5mg/kg) el intestino se comienza a regenerar y a restaurar la arquitectura celular y funcional, fundamentalmente a nivel de las criptas de Lieberkühn. A pesar de esta regeneración las vellosidades siguen estando dañadas, pero si se observó un incremento de la mitosis celular frente a los animales control, que indica un inicio de regeneración tisular. Las vellosidades en este punto de la evolución de regeneración son edematosas con eritrocitos en diferentes estadios de necrosis y se describe una disrupción del tejido epitelial de recubrimiento. Por el contrario en el intestino grueso se describe una incipiente destrucción tisular con desprendimiento de células apoptóticas desde la luz intestinal. Además se observó hemorragia en la zona de la lámina propia y acumulación de células apoptóticas y células descamadas fuera del tejido intestinal. Se describió que el daño generado en el intestino grueso se recupera a los 9 días tras el tratamiento.

De la misma manera Jiménez, P. y cols. (b) (2013) evalúan la toxicidad en ratón de la ebulina-f administrada de forma intraperitoneal. Describieron como esta proteína genera los mismos daños a nivel intestinal

que la nigrina-b, pero a menor dosis que ésta. Se indica, además, que el mayor daño (dosis letal) se genera a las 24 horas tras la administración de la dosis de 5 mg/kg de la ebulina-f.

En el mismo estudio de Jiménez, P. y cols. (b) (2013) se realizó un análisis histológico de los tejidos de los animales. De manera general no se demostraron daños significativos en los tejidos animales menos en la zona intestinal. En los animales que se trataron con ebulina-f a dosis de 5 mg/kg se descubrió, a las 24 horas tras el tratamiento, que la arquitectura intestinal estaba alterada con profundos daños a nivel de las criptas de Lieberkühn del intestino delgado (Figura I.10). Las criptas en comparación con las de los animales control aparecieron con una amplia desestructuración.

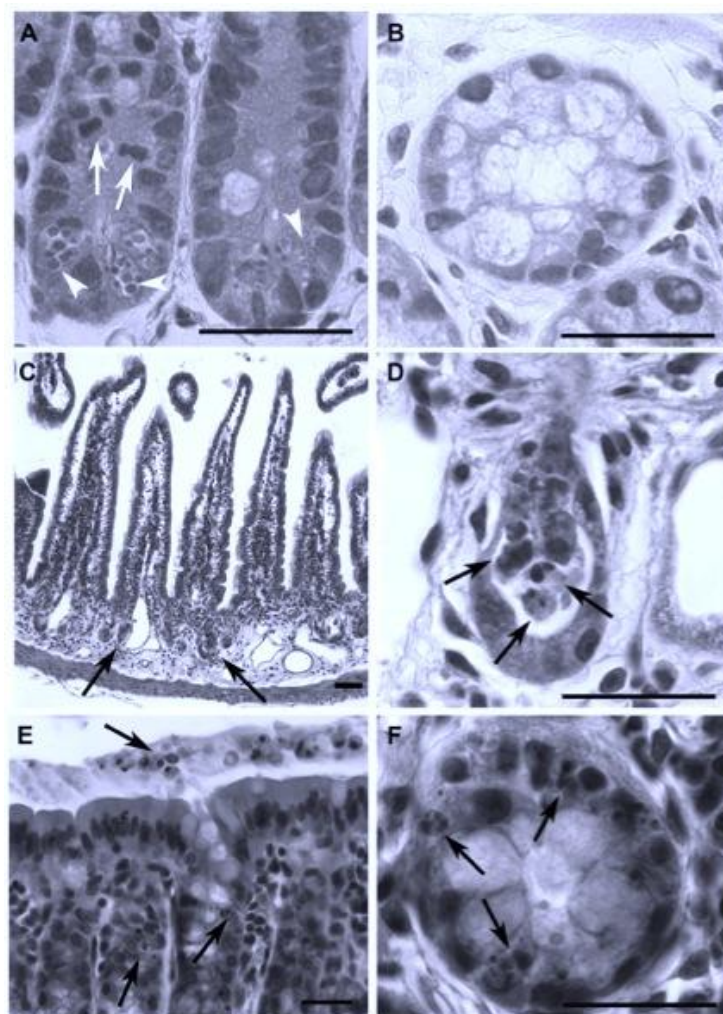


Figura I10. Análisis histológico del tejido intestinal a las 24 horas y 3 días tras el tratamiento con ebulina-f. Las muestras de intestino delgado (A), y el intestino grueso (B) de los animales de control y de intestino grueso y delgado de los animales 24 h después de la IP administración de 5 mg/kg de peso corporal ebulina-f (C-F) se tiñeron con hematoxilina-eosina. A: detalle de una cripta del intestino delgado; B: detalle de una cripta típica del intestino grueso; C: vista general del intestino delgado dañado; D: detalle de una cripta típica dañado; E: vista general de los daños intestino grueso; F: detalle de la sección transversal de una cripta. Las flechas blancas indican mitosis; puntas de flechas apuntan a los gránulos de las células de Paneth, flechas negras señalan a las células apoptóticas en ambos intestinos. Barra de escala = 25 μ m. (Jiménez y cols., 2013b)

Se pierde la estructura de tubo característico con células ordenadas en el eje y además se describe como en la base de las vellosidades se observa desorden y desestructuración celular. Por otra parte se describe daño sobre las TAC que genera el desprendimiento de las vellosidades saliendo a la luz intestinal. Se sugiere que el ataque de la ebulina-f se desarrolla desde el lado seroso del epitelio intestinal con ataque sobre las TAC cuya muerte desencadena al final la muerte y pérdida de las vellosidades. Sobre el intestino grueso describen como se genera daño en la zona del primer tercio de las criptas pero de escaso interés por la leve lesión generada.

1.4. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y MECANISMO DE ABSORCIÓN DE LA VITAMINA C.

La vitamina C o ácido L-ascórbico es un glúcido ácido derivado del ácido gulónico, que se sintetiza a partir de la glucosa. Su principal característica es la de oxidarse en ácido dehidro-L-ascórbico para formar un sistema redox que puede ser la base de sus principales acciones fisiológicas (Tabla I3). De forma natural está ampliamente distribuido y se encuentra abundantemente en frutas, verduras y órganos de animales, como el hígado y el riñón. Las plantas y ciertos animales lo sintetizan a partir de hexosas, pero la especie humana carece de la enzima que convierte la L-gulonolactona en 2-oxo-L-gulonolactona y ácido ascórbico. (Castaño, M.T., 1998; Bürzle y cols., 2013; Sweetman, Sean C.; Ed.36^a).

Tabla I3.- Características de la vitamina C.

Características físicas	Aspecto. Polvo cristalino blanco o casi blanco o cristales incoloros que se colorean por exposición al aire y a la humedad. Formula molecular. $C_6H_8O_6$ Peso molecular. 176,1g/mol pH al 5 %. 2,2-2,5
Solubilidad	Fácilmente soluble en agua y en metanol. Soluble en alcohol y acetona. Insoluble en cloroformo y éter.

Acciones orgánicas	La vitamina C estimula la síntesis de colágeno mediante la activación de la enzima que cataliza la hidroxilación de la prolina, convirtiéndola en hidroxiprolina, aminoácido estructural del colágeno. El déficit de vitamina C produce un colágeno defectuoso y débil. Por otra parte estimula la maduración de los eritrocitos y mejora la absorción del hierro. Además, actúa como cofactor de numerosas reacciones enzimáticas de oxidación, actúa en el metabolismo del hierro y del cobre. Y por último también actúa como antioxidante y neutralizante de radicales libres oxigenados.
Aplicaciones	Anemias, tabaquismo, en embarazo y la infancia: la vitamina C es necesaria para la correcta formación y desarrollo de los tejidos óseos del feto y del niño. Por último, actúa sobre los radicales libres producidos por las mitocondrias, vinculados a enfermedades degenerativas y a procesos de envejecimiento.

El mecanismo de absorción del ácido ascórbico (Figura I.11) y de su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico, según Malo, C. y Wilson, J.X. (2000) son diferentes. Se indica en el estudio de estos autores que la forma reducida, el ácido ascórbico, se absorbe intestinalmente mediante un sistema de difusión activa donde interviene un canal dependiente de sodio. Este canal para funcionar necesita dos iones sodio que son movidos gracias a los transportadores de glucosa GLUT-5 y el SGLT-1. Sin embargo, se indica que la absorción de la forma oxidada se da por difusión facilitada, independiente de los transportadores de glucosa y a favor de gradiente (Figura I11). Tras la absorción casi instantánea de la vitamina C, ésta pasa

completamente a la forma reducida de ácido ascórbico dentro del enterocito donde se almacena en estado de reducción. Posteriormente, pasa por la zona basal de la célula mediante algún mecanismo todavía no descrito, aunque quizás pudiera ser por transporte (Esteve y cols., 1997; Rivas y cols., 2007; Takanaga y cols., 2004).

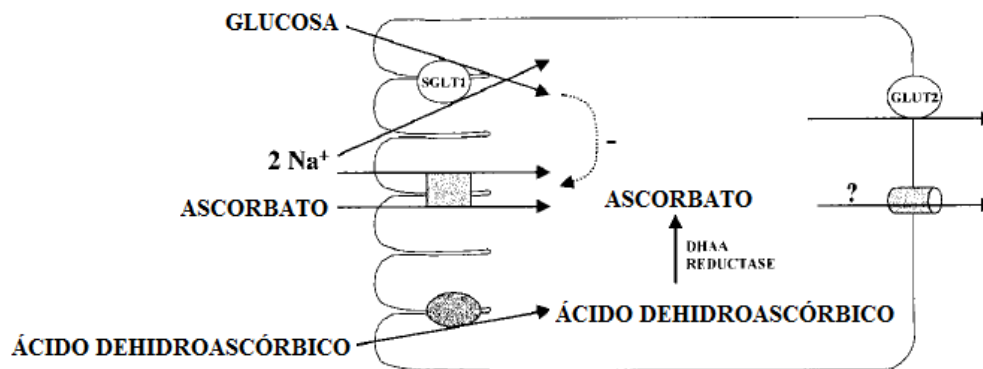


Figura I11. Mecanismo de absorción del ácido ascórbico (Malo, C. y Wilson, J.X., 2000) Adaptado.

1.5. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y MECANISMO DE ABSORCIÓN DE LA GLUCOSA.

La glucosa es un monosacárido de naturaleza hexosa que forma parte de la mayor parte de los seres vivos. Esta puede estar como sistema estructural (p.ej. cadenas de celulosa, hemicelulosa), sistema de reserva de energía (p.ej. glucógeno, almidón), sobre las células formando el glucocalix y libre disuelta en los líquidos orgánicos para la fácil disponibilidad y uso por parte de los organismos vivos (Young y cols., 10).

La glucosa (Tabla I.4) se puede sintetizar por parte de los organismos mediante la gluconeogénesis. Este proceso se lleva a cabo por parte de los organismos no vegetales para mantener los niveles vitales de glucemia, mientras que en los vegetales se realiza para la nutrición del propio vegetal por medio de la fotosíntesis donde, básicamente, se genera glucosa a partir de dióxido de carbono, agua y la energía solar

Tabla I4. Características de la Glucosa.

Características físicas	Aspecto. Polvo cristalino blanco que se colorea mediante la aplicación de calor por la caramelización y la reacción de Maillard. Tiene olor ligero y dulzor a la hora de consumirse. Fórmula molecular. $C_6H_{12}O_6$ Peso molecular. 180,2 g/mol pH 5 % 5,5-6,0
Solubilidad	Fácilmente soluble en agua y en alcohol.

Acciones orgánicas	Los niveles de glucosa basales son esenciales para el mantenimiento de la vida del organismo. Es tan importante el mantenimiento de estos niveles porque al disminuir de los límites umbrales se da la muerte del organismo principalmente por la muerte cerebral.
Aplicaciones	Para la reconstitución de la volemia sanguínea se hacen sueros al 5% que se inoculan directamente al torrente sanguíneo del paciente. Por otra parte, en industria farmacéutica, también se emplea para hacer jarabes simples, como diluyente y como formador de capas de recubrimiento en grajeados. Además se utiliza de forma amplia en confitería y en alimentación.

El mecanismo de absorción de la glucosa (Figura I.12) se realiza por todo el intestino por medio de transportadores activos dependientes de sodio con gasto de energía, la SGLT-1, que se encuentran situados en la zona en cepillo de la luz intestinal. Posteriormente la glucosa se almacena en los enterocitos de los que sale por la zona apical gracias a transporte facilitado por la proteína GLUT-2, que es un transportador independiente de sodio. (Dray, C. y cols., 2013; Kellett, G. L. y cols., 2008).

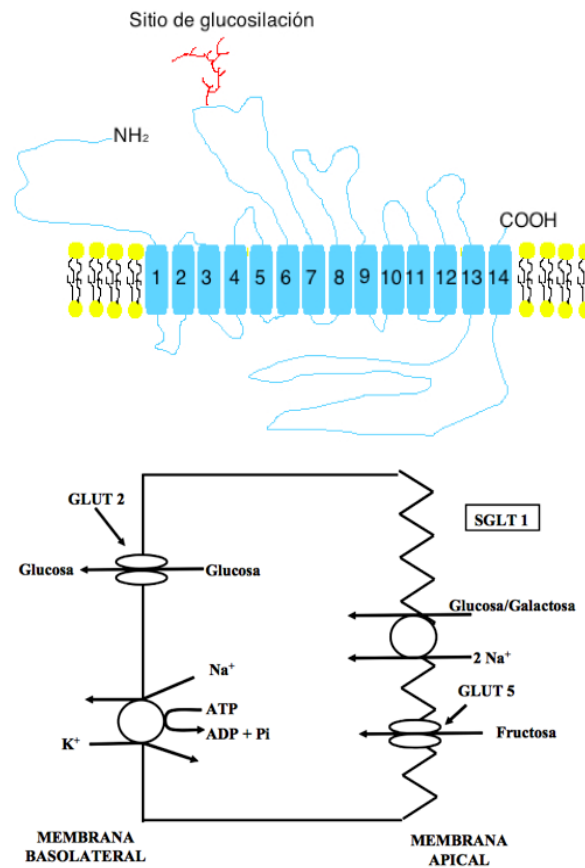


Figura I.12.- Mecanismo de absorción de la glucosa. En la imagen superior hay un esquema del transportador SGLT-1 que se encuentra en el borde en cepillo de los enterocitos. En la imagen inferior hay un esquema adaptado de Castrejón, V. y cols. (2007) del mecanismo de absorción intestinal de la glucosa.

2. OBJETIVOS.



En estudios previos de nuestro equipo de investigación se ha caracterizado un modelo de daño-regeneración intestinal de tipo enzimático, como consecuencia de la administración intraperitoneal de dosis subletales de nigrina-b, una RIP obtenida de la corteza de *S. nigra* L. Desde un punto de vista biofarmacéutico y farmacocinético, el poder contar con un modelo reversible que simule cuadros de malabsorción oral, es una herramienta fundamental para el desarrollo galénico de nuevas formulaciones para este tipo de patologías.

El objetivo de este trabajo consiste en evaluar la capacidad de la ebulina-f, una RIP obtenida de frutos de *S. ebulus* L. para generar dicho tipo de modelo. Para ello, se va a evaluar la posible modificación de la absorción de la vitamina C o glucosa como marcadores tras su administración oral en ratones Swiss CD1.

Planteamiento experimental: se plantea la administración de la vitamina C o glucosa, según corresponda, en bolo oral en un grupo de ratones control y en otro grupo en el que previamente se ha administrado la proteína ebulina-f. Se realizarán los perfiles de concentración plasmática/tiempo en ambos tipos de ratones y se calcularán los parámetros farmacocinéticos como $C_{m\acute{a}x}$, $t_{m\acute{a}x}$ y la biodisponibilidad oral que servirán para establecer la viabilidad de esta RIP para originar el modelo de daño y regeneración intestinal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.



3.1. MATERIAL DE LABORATORIO.

3.1.1. Equipos.

- Agitador de tubos: Raypa.
- Agitador magnético ACS-160: J.Jimeno S.A.
- Balanza de precisión: KERN 572, KERN ABS y Mettler Toledo AJ100.
- Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6).
- Baño Ultrasons H. Selecta.
- Bomba de vacío. Ref. Büchi Vac V-500.
- Bomba peristáltica Selecta PERCOM N-M.
- Célula con agitación (concentrador): Amicon.
- Centrifuga: Digiten-R ORTO ALRESA.
- Columnas cromatográficas: GE Healthcare.
- Concentrador de 50 y 10 mL: Amicon.
- Congelador -24°C: Fagor.
- Cronómetro.
- Equipo de agua Hellix Millipore.
- Equipo de HPLC Jasco.
- Espectrofotómetro UV/Vis: HELIOS α Thermo y Beckman DU-7
- Estufa: P.SELECTA 150 litros.
- pHmetro: basic 20 + CRISON.
- Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit.
- Termómetro.

3.1.2. Material fungible.

- Botellas de vidrio de diversos volúmenes.
- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro 104-QS Hellma 10mm.
- Cubetas de poliestireno para colorimetría.
- Embudos.
- Espátulas.
- Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.
- Imanes agitadores.
- Jeringuillas de plástico.
- Matraces erlenmeyers de diferentes volúmenes.
- Membranas 450 47 mm 0,45µm de Pall.
- Membrana Inmobilon P de polivinilfluoruro (PVDF) 0,45 µm.
- Membranas de filtración MF Millipore 0,45 µm.
- Microtubos de plástico de 1,5 y 2 mL.
- Papel de filtro convencional (Afora).
- Papel de filtro Whatman N°3.
- Parafilm M.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 mL.
- Placas Petri cuadradas.
- Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes.
- Puntas de pipeta automática
- Puntas especiales de pipetas para cargar geles de poliacrilamida.
- Tubo de silicona de diferentes diámetros.
- Tubos de plástico de 5, 15 y 50 mL.
- Tubos eppendorf.
- Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

3.1.3. Reactivos químicos.

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo quedan incluidos en la siguiente tabla, siendo todos ellos de una alta pureza (Tabla M1). Todas las soluciones se preparan con agua tipo Elix y se esterilizan.

Tabla M1. Reactivos utilizados.

Reactivos	Marca
• Acetona.	Merck.
• Ácido clorhídrico.	Merck.
• Ácido sulfúrico.	Panreac.
• Ácido metafosfórico.	Sigma.
• Ácido ortofosfórico	Scharlab.
• Acrilamida/bisacrilamida 37,5.1	Ameresco.
• Azul de Evans.	Sigma.
• Cloruro de Potasio	Sigma.
• (1,4)-Ditiotreitol.	Scharlau.
• Di-potasio hidrógeno fosfato.	Merck.
• Dodecil sulfato sódico	Fluka.
• Fosfato de potasio monobásico.	Sigma.
• Fosfato de sodio monobásico.	Sigma.
• Glicerol.	Merck.
• Glicina para electroforesis.	Sigma.
• Glucosa	Sigma.
• Glutaraldehído.	Sigma.

• Hidróxido de sodio.	Carlo Erba.
• Isoflorano (Isoflo®)	Steve
• Lactosa	Panreac.
• Metanol.	Merck.
• N,N, dimetilformamida	Merck.
• N, N, N', N', tetrametiletileno	Sigma.
• N-acetilcisteína	Sigma.
• Peróxido de hidrógeno	Sigma.
• Persulfato amónico.	Sigma.
• Potasio hidróxido.	Panreac.
• Potasio hidróxido 85 %.	Panreac.
• Sepharose 6B.	GE.
• Sigma marker (marcadores de masa molecular).	Sigma.
• Sodio carbonato.	Panreac.
• Sodiocloruro.	Panreac.
• Sodio hidróxido.	Panreac.
• Sodio acetato.	Sigma.
• Sodio carbonato.	Sigma.
• Sodioidihidrógeno.	Merck.
• Sodiohidrógeno carbonato.	Panreac.
• Sodio hidróxido.	Baker.
• Sodio fosfato dibásico.	Sigma.
• Sulfato de amonio.	Fluka.
• Superdex 75.	GE.
• Trypsin.	Merck.
• Vitamina C.	Fagron.

3.1.4. Materiales biológicos.

3.1.4.1 Animales de laboratorio.

Todos los estudios en animales se han llevado a cabo con ratones Swiss CD1 en las condiciones que indica la legislación vigente y con los permisos de los comités de experimentación animal correspondientes.

Los ratones durante los periodos de ensayo se han mantenido en condiciones de estabulación controlada con lecho higiénico en correcto estado de limpieza (cambio de los lechos utilizados, al menos, cada dos días), mantenimiento a una correcta temperatura y humedad controlada que permita el buen desarrollo y crecimiento de los animales, libre alimentación de los animales y acceso libre a agua potable.

Los animales han recibido alimentación, al comienzo del estudio, mediante una dieta que consistió en pellets “Alimentcomplet” (piensos completos de alimentación para ratones y ratas en fase de crecimiento) de laboratorios SAFE (Route de Saint Bris, 89 290, AUGY France), lote 12291 o pellets “5002 certificateRodentDiet” (piensos completos de alimentación para ratones y ratas en fase de crecimiento y animales reproductores) de laboratorios LabDietcon lote Feb19134. Durante todo el periodo de ensayo los animales recibieron la alimentación *ad libitum*.

Por otra parte, se han mantenido con unos ciclos de luz-oscuridad de 12 horas para mantener unas condiciones que no alteren los ciclos de sueño de los animales. Con ello se logra el minimizar posibles estadíos o etapas de estrés o estados de nerviosismo innecesario que pudiera modificar los resultados de los ensayos realizados.

Por último indicar que los animales recibidos directos desde el laboratorio han sido acondicionados para poder estabilizar su estado tras el viaje. Los ensayos no se han realizado hasta que han transcurrido un mínimo de dos semanas desde la recepción de los mismos (Real Decreto 53/2013).

3.1.4.2. Material vegetal.

En una primera parte del estudio, el material vegetal de partida son frutos verdes congelados almacenados en un congelador a -24°C y recogidos durante los meses junio y julio en Barruelo del Valle (Valladolid). En el momento de la utilización se descongelan sin romper la cadena del frío para mantener las condiciones óptimas de todas las estructuras y sustancias contenidas en cada uno de los frutos. Con ello se consigue que la extracción de la ebulina-f sea idéntica a una extracción directamente obtenida de frutos frescos sin manipulación.

Por otra parte se realizó una extracción desde frutos verdes liofilizados que fueron recolectados en Escalona (Toledo) a mediados de verano (junio-julio). Tras la recolección, se almacenaron congelados a una temperatura de -24°C , a la espera de la liofilización. Tras la liofilización se conservaron nuevamente congelados y protegidos dentro de bolsas antihumedad herméticas con sales deshumidificantes alrededor.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Obtención de ebulina-f.

El proceso de obtención y caracterización de ebulina-f de alta pureza que se ha empleado en la realización de esta tesis ha sido previamente descrito por Citores y cols., 1998 y Jiménez y cols., 2013. Brevemente, tras la obtención del extracto crudo y su posterior clarificación, el sobrenadante es sometido a una cromatografía de afinidad para obtener los componentes con afinidad por D-galactosa. A continuación se lleva a cabo una cromatografía de exclusión molecular y la solución resultante es dializada frente a agua desionizada y concentrada hasta alcanzar concentraciones en el intervalo 2,5-4,0 mg/mL. La actividad de la preparación fue determinada mediante hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos y su pureza mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas (Citores y cols., 1998).

3.2.1.1. Extracto crudo.

Para obtener el extracto crudo, 200 g de frutos verdes de *Sambucus ebulus* L. congelados son molturados en un mortero de porcelana con una pequeña porción de tampón de extracción (cloruro de sodio 140 mM y solución de fosfato sódico 5 mM). La pasta resultante se pone en contacto con 800 mL de tampón de extracción (añadido lentamente y en pequeñas cantidades) en agitación constante durante 12 horas a 4° C. Posteriormente se realiza la clarificación del extracto mediante una gasa doble de nylon. A continuación se lleva a cabo una primera centrifugación durante 45 min a 7500 g y 4° C en la centrífuga Dugicen-R de rotor basculante RT142 en 4 tubos de 50 mL. De la primera centrifugación se toman los sobrenadantes y se hace una segunda centrifugación en las mismas condiciones pero durante

30 min. Tras ello se recoge de nuevo el sobrenadante que es el extracto crudo clarificado. El extracto crudo clarificado se filtra por un filtro de papel (Anoia de 73g/cm^3) de doble capa para eliminar el mucílago obteniendo el extracto crudo definitivo.

3.2.1.2. Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose 6B.

La cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose 6B se realiza en dos fases, una primera fase de fijación de las lectinas y una segunda fase de elución de las lectinas fijadas.

- Fase de fijación de las lectinas del extracto. El proceso ha de realizarse a 4°C conforme al proceso descrito por Citores y cols., 1998 y Jiménez y cols., 2013. Para ello, una vez activado el relleno conforme a las instrucciones del fabricante, y asegurando que el agua a 4°C circula correctamente por el refrigerante, se añade el mismo a través de las paredes internas de la columna y se elimina el exceso de solvente para permitir el equilibrado del sistema. Posteriormente se incorpora lentamente a la columna la totalidad del extracto crudo, dejando que se deslice por las paredes de la columna para no desestructurar la malla tridimensional de Sepharosa y se deja que eluya. A continuación se circula el equivalente a tres volúmenes de columna de buffer de lavado (cloruro sódico 280 mM y fosfato sódico 5 mM) para asegurar que se han eliminado restos sin afinidad por D-galactosa.



Figura M1. Cromatografía de afinidad del extracto de frutos verdes de *S. ebulus* L. en AT-Sepharose 6B. Izquierda, detalle del montaje de la columna GE-Pharmacia KX50 (5 x 10 cm) cargada con AT-Sepharose 6B.

- Fase de elución de las lectinas fijadas. Una vez finalizado el proceso de lavado, se desconecta el refrigerante y se deja equilibrar el sistema a 20-25° C. En este rango de temperatura la afinidad de las proteínas por el polímero disminuye drásticamente. A continuación se añade un volumen de tampón de lavado con lactosa 200 mM ya que debido a su mayor afinidad por el relleno, es capaz de desplazar a las lectinas de su unión a la Sepharosa 6B. Desde que comienza a eluir el tampón de lactosa se recogen alícuotas, a la salida de la columna, de 10 mL. Estas muestras se miden en el espectrofotómetro a 280 nm, siendo el blanco el buffer de lactosa. Se hace una representación de las medidas y se obtendrá un perfil con un pico proteico que indica cuales son las alícuotas que deben seleccionarse para la separación por exclusión molecular por la columna Superdex 75[®]. Las alícuotas que están dentro del pico de la lectura, esto es el extracto de lectinas, se almacenan en nevera a 4° C hasta la posterior purificación de la ebulina-f mediante la columna Superdex 75[®].

3.2.1.3. Cromatografía de exclusión molecular.

Lo primero que se debe hacer es una concentración del extracto de lectinas en una celda Amicon. Para ello se procede al montaje de la celda (soporte basal, membrana semipermeable, cámara de concentración, agitador magnético, cierre superior y sistema de retención metálico) conectándola a un sistema de circulación de aire o de gas a alta presión, que hace posible la concentración de la muestra. Se recomienda el empleo de gas inerte como nitrógeno o aire atmosférico a alta presión por la posible contaminación de las lectinas con otros gases como el cloro. El proceso de concentración se basa en que la presión del gas obliga a que el medio líquido pase por la membrana y salga del sistema quedando retenidas las lectinas en la cámara de concentración. El proceso presenta un punto limitante y es que la concentración no puede ser muy elevada por precipitar las proteínas quedando inutilizadas, por ello se recomienda como máximo la concentración de 90 mL de extracto de lectinas a 6 mL que es el extracto de lectinas concentrado.

Una vez acondicionada la columna, se corta el suministro del buffer de proteínas para permitir el bombeo del extracto de lectinas concentrado. Tras la inyección se mantiene un bombeo constante de buffer de proteínas mediante una bomba peristáltica de unos 10 mL por minuto para que la elución sea constante. En la salida inferior de la columna se coloca una probeta para medir los primeros 70 mL que se descartan, por haberse comprobado en estudios anteriores que no presentan proteína. A partir de los 70 mL se toman alícuotas de 5 mL o de 10 mL que se miden en el espectrofotómetro para ver los perfiles proteicos para poder conseguir las alícuotas de ebulina-f purísima. Se mide a una longitud de onda de 280 nm frente al blanco que es el mismo que se emplea para las alícuotas que se extraen de la columna de Sepharosa 6B. Cuando se representan las medidas

se obtiene un perfil con un doble pico donde el primer pico se corresponde con lectinas que no son ebulina-f mientras que el segundo pico es la ebulina-f purísima. Las alícuotas con ebulina-f purísima se mezclan y se realiza la diálisis para eliminar la lactosa. Se hace introduciendo las alícuotas en las membranas y dejándolas en nevera a 4° C en agitación continua sumergidas en un volumen de 2 L de agua que se cambia cada 12 horas hasta 4 veces.

Las alícuotas que contienen la ebulina-f purísima dializada durante las 48 horas se concentran en la celda Amicon anteriormente descrita. Tras la concentración a unos 6 mL de volumen final, se almacena en nevera a 4° C para la realización de las pruebas de viabilidad y riqueza. Tras ello, se alicuotan y se congelan a -18° C hasta su uso en los ensayos pertinentes (Figura M2).



Figura M2. Columna Superdex 75[®] a la izquierda, celda Amicon[®] en la zona derecha superior y las membranas de diálisis empleadas en la imagen inferior derecha.

3.2.1.4. Caracterización de la ebulina-f obtenida.

Para calcular la riqueza en ebulina-f de la preparación obtenida, se emplea la metodología descrita en 1977 por Kalb y Bernlohr. Para ello se determina la absorbancia de la muestra a 230, 260 y 320 nm y se despejan los valores obtenidos en la siguiente expresión:

$$[\text{Proteína en } \mu\text{g/mL}] = 183 (A_{230} - A_{320}) - 75,8 (A_{260} - A_{320})$$

Para la medida de las absorbancias se utiliza un espectrofotómetro HELIOS α Thermo y una cubeta de cuarzo Hellma con un paso de luz de 10 mm. Como blanco se usa el filtrado resultante de la concentración de dicha proteína con la celda Amicon.

Para evaluar la pureza en ebulina-f de la preparación obtenida, se llevó a cabo una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico. Esta técnica es conocida como SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) y fue descrita por primera vez por Laemli en 1970. La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. En unas condiciones electroforéticas determinadas, la diferente movilidad de cada molécula define su comportamiento y separación en el espacio. El SDS desnaturaliza las proteínas de la muestra y se une a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa:masa constante (1,4 g SDS/g de proteína), de modo que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada por la de las múltiples moléculas de SDS y ésta es proporcional al tamaño (n° de aminoácidos). Para ello se emplea un sistema de electroforesis miniVE-Amersham Biosciences con minigeles (70 x 80 x 0,75 mm) formados por dos fases con distinta concentración de

poliacrilamida. Para geles del 15% el gel separador se forma con una mezcla de un 14,6% (p/v) de acrilamida y un 0,4% (p/v) de bis-acrilamida, Tris-HCl 375 mM (pH=8,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,1% (p/v) y TEMED 0,07% (v/v). Por su parte, el gel de apilamiento o de “stacking” está formado por 3,9% (p/v) de acrilamida 0,1% (p/v) bis-acrilamida, Tris-HCl 125mM (pH=6,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,08% (p/v) y TEMED 0,08% (v/v).

Antes de su introducción al sistema electroforético, las muestras se incuban durante 5 minutos a 100°C en una solución formada por tampón Tris-HCl 62,5 mM (pH=6,8), SDS al 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) y 0,025% (p/v) de azul de bromofenol. Una vez las muestras son depositadas en los pocillos, se completa el volumen de los dos compartimentos de la cubeta con tampón Tris-HCl 25 mM (pH=8,3), glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v) y se aplica una corriente eléctrica de 25 mA de intensidad. El proceso se realiza a 20°C y finaliza cuando el frente alcanza el extremo inferior del gel.

Las bandas de proteínas, una vez terminada la electroforesis, se visualizan tiñendo los geles con una solución de azul de Coomassie brillante R-250 (azul de Coomassie R-250 al 1%, metanol, ácido acético, agua Milli-Q -12,5:50:10:100 v:v:v:v). La tinción se realiza con agitación suave durante dos horas. Por último, se dispone el gel en solución decolorante compuesta por ácido acético, metanol y agua Helix-Millipore (10:10:80 partes en volumen) y se incuba en agitación suave durante 12 horas para eliminar el exceso de coloración y que sólo queden teñidas las proteínas, cambiando la solución decolorante tantas veces como sea necesario.

Para determinar la viabilidad de la ebulina-f se evaluó su capacidad aglutinante de eritrocitos. El protocolo del ensayo es el siguiente:

- Disponer 50 μ L de soluciones de proteína de concentraciones crecientes en una placa de 96 pocillos con el fondo redondo (Nunc).
- Añadir en cada pocillo 50 μ L de una suspensión de eritrocitos humanos del grupo 0 al 1% (v/v) en tampón (NaCl 0,14M, fosfato monosódico 5mM, pH=7,5).
- Mezclar y dejar reposar a 25°C durante 20 minutos.

En los pocillos con concentraciones de proteína superiores a la mínima concentración necesaria para provocar la aglutinación de los eritrocitos, se apreciará una suspensión de aspecto rosado mientras que en el resto de pocillos los eritrocitos precipitarán formando un botón de coloración rojo intenso.

3.2.2. Administración intraperitoneal de dosis subletales de ebulina-f .

3.2.2.1. Determinación de dosis subletales.

Se han realizado perfiles de toxicidad de varias lectinas inhibidoras de ribosomas para determinar los niveles de toxicidad o inocuidad indispensables para desarrollar los modelos de daño-regeneración.

Gayoso y cols. (2005) estudiaron diversas dosis de nigrina-b y de ricina. Para la realización del estudio dividieron los ratones en grupos de cinco en los tratamientos con ricina y en grupos de nueve para los animales

tratados con nigrina-b. Se investigaron diferentes dosis para cada una de las sustancias, así para la ricina se investigaron las dosis de 8 µg/kg, 5 µg/kg, 3 µg/kg y 1 µg/kg, mientras que para la nigrina-b se investigó con 16 mg/kg, 10 mg/kg, 7,5 mg/kg y 5 mg/kg. Todas las administraciones se realizaron por vía intravenosa y los animales se mantuvieron en idénticas condiciones de estabulación.

Una de las conclusiones a la que llegan los autores (Gayoso y cols., 2005) es a la dosis subletal con la que se puede trabajar con la nigrina-b para generar el modelo de daño-regeneración. La nigrina-b para generar el modelo sin causar muerte a los animales se puede administrar una dosis subletal de 5 mg/kg por vía intravenosa. Esta dosis es 5000 veces mayor a la de la ricina cuyo valor es de 1×10^{-3} mg/kg. Con ello confirmaron que la nigrina-b pertenece a la familia de las RIPs tipo II de baja toxicidad.

Por su parte Jiménez y colaboradores (2013b) evaluaron la mortalidad en ratón de la ebulina-f administrada de forma intraperitoneal a dosis de 2,5 mg/kg, 3,75 mg/kg y 5 mg/kg. En el estudio se observó que cuando se administra la dosis máxima ensayada (5 mg/kg), aunque se coloque el alimento y el agua cerca de los animales pierden por completo el apetito y la sed, muriendo a los 2-4 días tras la administración de la dosis.

Como dosis subletal para la ebulina-f en este estudio se establece un valor de 2,5 mg/kg. Esta dosis de 2,5 mg/kg va a ser la referencia tomada como máxima dosis a utilizar en este estudio. No obstante en algunos ensayos, debido a pequeñas variaciones en la determinación de la riqueza, el estado basal de los animales, la metodología experimental, etc. ha sido necesario establecer como dosis subletal valores de 2,2 mg/kg.

3.2.2.2. Evolución del peso del animal respecto al tiempo.

La administración parenteral de diferentes dosis de RILs de *Sambucus* provoca una disminución de peso en los animales de experimentación ensayados como consecuencia de la lesión provocada (Jiménez y cols., 2013a).

En el presente estudio, se han registrado los pesos individuales de todos los animales (control o problema) por medio de una balanza de precisión. Para controlar las posibles oscilaciones derivadas de los propios movimientos de los animales, se ha empleado un sistema de retención específico diseñado para retener e inmovilizar a los animales durante la medición. Siempre que ha sido posible, el registro se ha realizado con el animal sedado para evitar un estrés innecesario.

3.2.2.3. Permeabilidad vascular.

Ogawa y cols. (2002) proponen un método para determinar la permeabilidad de la pared intestinal y por tanto evaluar el daño provocado por el dextrán sulfato sódico. El estudio se basa en que el azul de Evans debido a sus características moleculares queda en el líquido intersticial y en sangre sin penetrar en los tejidos; al no ser capaz de penetrar en los tejidos, se puede discernir el grado de daño tisular por la presencia de una mayor cantidad de azul de Evans presente en los tejidos dañados respecto de los tejidos control. El incremento de la concentración de azul de Evans se debe a la rotura de los vasos sanguíneos que si permiten la tinción de los tejidos por permitir el drenaje de las moléculas (Jiménez y cols., 2013b). En este estudio se observó que el mayor daño se produce a las 48 horas, si bien, las diferencias no son estadísticamente significativas respecto a 24 horas. A las

72 horas la absorbancia disminuye significativamente demostrando un descenso en la permeabilidad vascular y por tanto una recuperación del tejido. En cualquier caso, la administración intraperitoneal de la RIL no produce una desestructuración tal que modifique el efecto barrera del epitelio intestinal, ya que esto provocaría una sepsis generalizada y la muerte del individuo en pocas horas.

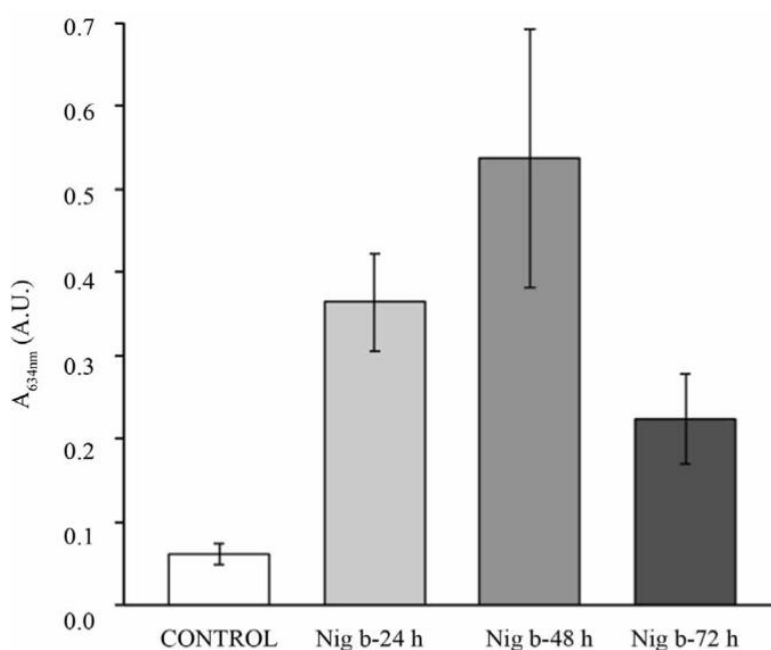


Figura M3.- Estudio de permeabilidad vascular de nigrina b
(Jiménez y cols., 2013a).

Para la realización del ensayo se utilizó el siguiente protocolo de manipulación y tratamiento tanto de los animales como de las muestras:

- Pesada de los animales (peso a t=0), marcaje y administración intraperitoneal de una dosis única de ebulina-f (5 mg/kg) en todos los animales salvo aquellos pertenecientes al grupo control.

- Mantenimiento de los animales recluidos en jaulas en condiciones optimas durante el tiempo necesario para poder comprobar los daños que se generan en cada grupo según el diseño experimental. Cuando se cumple el tiempo tras el pinchazo intraperitoneal de ebulina, se procedió de la siguiente manera:
 - Control del peso y retirada de la alimentación sólida para facilitar posteriormente la limpieza del aparato digestivo. Mantener los animales en ayuno controlado de 2 horas con agua *ad libitum*.
 - Administración I.V. de 100 µL de la solución de azul de Evans al 5%.
 - Distribución durante 1 hora. El animal se mantiene con acceso ilimitado a agua pero no a alimento sólido.
 - Sacrificio de los animales en una cámara hermética con Isoflurano[®].
 - Escisión quirúrgica del aparato digestivo completo (desde el estómago hasta el ano) y limpieza del mismo mediante la retirada de los plexos sanguíneos además de la eliminación de los elementos sólidos del interior del tubo digestivo.
 - Medición de la longitud del intestino delgado en su totalidad y del intestino grueso. Pesada de las partes por separado en balanza de precisión.
 - División del intestino delgado en tres porciones.
 - Disposición de cada parte (estómago, 1^{er} tercio de intestino delgado, 2^o tercio, 3^{er} tercio y colon) en 3 mL de dimetilformamida (DMF) y mantener a temperatura ambiente para la extracción del azul de Evans durante 12h.
 - Medición de la absorbancia del extracto a una longitud de onda de 634 nm.

3.2.3. Influencia de la administración IP de dosis subletales de ebulina-f en la cinética de absorción oral de vitamina C.

3.2.3.1. Protocolo del estudio.

El estudio de la influencia de la administración IP de dosis subletales de ebulina-f en la cinética de absorción de vitamina C, se realizó conforme al siguiente protocolo:

- Control del peso de los animales (peso a $t=0$), marcaje y administración intraperitoneal de una dosis única de ebulina-f (2,5 mg/kg). La inoculación debe administrarse en todos los animales salvo aquellos pertenecientes al grupo control.
- Dejar a los animales separados por grupos en jaulas individuales con condiciones óptimas durante el tiempo predeterminado mediante el diseño experimental. Tras este periodo de tiempo se procedió de la siguiente manera:
 - Control del peso de cada animal y retirada del alimento sólido durante dos horas para que a la hora de administrar el bolo oral de vitamina C no sea regurgitado por el animal.
 - Sangrado de los animales mediante punción retro-orbital a los 30 min, 80 min, 120 min, 180 min y 1440 min.
 - Extracción del plasma mediante centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 10 min en tubos BD. Vacutainer[®].
 - Estabilización de la muestra mediante incorporación de ácido metafosfórico (MPA) y 1,4- Ditiotreitól (DTT).
 - Análisis de la concentración de vitamina C en HPLC con el método previamente validado.

3.2.3.2. Puesta a punto de la técnica analítica por HPLC y adecuación al protocolo.

Lo primero que se realizó fue una validación del método analítico. Esto es, el conjunto de procesos operacionales cuya finalidad es la determinación, mediante las pruebas de laboratorio necesarias, que demuestren que el método analítico utilizado tiene las características adecuadas para cumplir los requerimientos establecidos. Los aspectos que deben ser abordados durante la validación de una técnica analítica aparecen convenientemente descritos en la guía Q2(R1) de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH):

- Linealidad e intervalo de linealidad.

La linealidad de un método es la capacidad que presenta este, dentro de un rango de datos dado, para obtener unos resultados que son directamente proporcionales a la concentración real de analito en la muestra.

El intervalo de linealidad de un método analítico se establece dentro del intervalo entre la concentración mayor y menor de la sustancia analizada (incluyendo ambas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el método analítico empleado tiene el nivel requerido de precisión, exactitud y linealidad. Siendo la precisión la dispersión de valores obtenidos tras repetidas mediciones de una misma magnitud y la exactitud es la cercanía de la media de los valores medidos respecto al valor real que se está midiendo, estando relacionada con los sesgos de las mediciones.

La medida de la linealidad y del intervalo de linealidad se realiza mediante parámetros estadísticos a partir, según las ICH, de la medida de cómo mínimo 5 concentraciones diferentes que estén dentro de la recta de regresión, con un coeficiente de determinación (r^2) lo más próximo al valor de la unidad. Indicar que se conoce por recta de regresión a la línea que mejor se ajusta a una nube de puntos (diagrama de dispersión) generando un coeficiente de correlación (r) lo más próximo a la unidad. Donde el coeficiente de correlación indica la fuerza y la relación entre dos variables, esto es, la capacidad de que una de las variables aumente cuando lo hace la otra de manera lineal. A partir de r se obtiene r^2 (en regresión lineal es el coeficiente de correlación de Pearson) que indica la buena calidad que presenta el modelo para poder replicar resultados siempre que el valor sea lo más próximo posible a la unidad.

La cuantificación de la linealidad se realiza mediante la medida de:

- Coeficientes de correlación y de determinación.
- Coeficiente de regresión: en estadística es la variación neta que presenta la variable dependiente (normalmente la representada en el eje de ordenadas o eje “y”) cuando se modifica en una unidad la variable independiente (normalmente la representada en el eje de abscisas o eje “x”).
- Desviación estándar de la pendiente: la cuantificación de este parámetro indica la dispersión que presenta la pendiente de la recta respecto de la nube de puntos. Cuanto mayor sea el valor peor es la regresión lineal, es decir, es más defectuoso el ajuste de la misma dentro del diagrama de dispersión. Definiéndose este como la representación sobre las coordenadas cartesianas (“x” e “y”) de los valores de dos variables para un mismo conjunto de datos. Estando esto relacionado con el factor de

respuesta que es, en cromatografía, la relación entre una señal producida por un analito, y la cantidad de analito existente en la muestra.

- Intercepción: punto de intersección entre la recta de regresión lineal y el eje de ordenadas. Este punto puede ser real (medida de la variable cuando el eje “x” es igual a cero) o extrapolada mediante la ecuación de la recta de regresión lineal.
- Desviación estándar de la ordenada en el origen: este parámetro indica la distancia existente entre la intercepción real (medida por nuestro método analítico) y la que debiera darse con cálculos matemáticos. En el caso de la regresión lineal es la distancia entre el punto de intersección y el punto de valor 0 para el eje “x” y de valor 0 para el eje “y” (0,0).
- Coeficiente de variación (CV): representa la relación entre la desviación de la variabilidad de la variable (σ), es decir del factor de respuesta, y la media de las medidas realizadas. Para el cálculo es importante que todos los datos sean positivos para que el valor del CV de positivo. Se considera que cuanto menor sea el valor las medidas son menos heterogéneas, es decir, son más homogéneas indicando que el método analítico es más lineal.

- Exactitud

La exactitud de un método analítico indica el grado de proximidad o concordancia que existe entre el valor que se acepta, valor de referencia aceptado o valor convencionalmente verdadero, y el valor encontrado en el análisis de la muestra. Al final el cálculo se realiza como el promedio de las

distancias entre los valores de varias muestras analizadas respecto de los valores realmente medidos.

Según la ICH Q2 para poder demostrar la exactitud de un método analítico es necesario el análisis de tres concentraciones de tres zonas de la recta de calibrado, que deben corresponderse con las concentraciones altas, medias y bajas de la misma. Para la determinación se hace el cálculo de las concentraciones de las medidas, a partir de la recta de calibrado, y se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación. A partir de los cálculos se determina la diferencia de los valores reales (las concentraciones de las que se parten) respecto a los extrapolados expresando los resultados como porcentajes de recuperación. Al final se estima con el test G de Cochran y mediante el test de la t de Student.

Para realizar el test G de Cochran primero se calcula el cociente entre la varianza máxima de todas las medidas respecto al sumatorio de las varianzas individuales de cada concentración medida, siendo esto la $G_{\text{experimental}}$ y se compara con unos valores tabulados que son las $G_{\text{tabuladas}}$. Al final si $G_{\text{experimental}} < G_{\text{tabuladas}}$ se confirma que las tres varianzas son equivalentes y por tanto se confirma que el método es lineal ya que las concentraciones no influyen en la variabilidad del método.

El test de la t de Student se basa en el cálculo de un valor experimental, denominado t_{exp} , que se compara con el valor tabulado para t en las tablas de t de Student, denominado t_{tab} . La t_{exp} , en el presente estudio, es el resultado de el triple de la resta de la recuperación media porcentual menos cien dividido todo ello entre el coeficiente de variación de los porcentajes de variación.

- **Precisión.**

En un método analítico se expresa la precisión como el grado de dispersión (grado de concordancia) entre unas mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra que se ha tratado homogéneamente bajo las mismas condiciones preestablecidas. Los análisis deben de realizarse con muestras homogéneas y originales, pero si no es posible se pueden emplear muestras preparadas o soluciones de los analitos. La precisión se puede indicar como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones. Según la ICH se deben tomar las medidas de tres réplicas, situadas en la zona de concentración media de la recta de calibrado, de una misma muestra homogénea y calcular su CV. La precisión puede ser tomada en cuenta en tres vertientes que son:

- Repetibilidad o repetitividad o precisión intraensayo: se describe como la precisión que se obtiene bajo las mismas condiciones operacionales como realizarlo durante un intervalo de tiempo corto (horas dentro de un mismo día), que todo lo realice un único analista, emplear una misma muestra y el mismo equipo. Según la ICH-Q2 se deben preparar y analizar seis muestras de cada zona alta, media y baja de la recta de calibrado calculando al final el CV.
- Precisión intermedia: es la obtenida dentro del mismo laboratorio dando así las diferencias intralaboratorio que se pueden producir al analizar muestras realizadas por diferentes analistas, diferentes equipos o análisis de la misma muestra homogénea en diferentes días. Si se ensaya la reproducibilidad, no es necesaria la precisión intermedia.

Según la ICH Q2 se deben analizar por duplicado tres muestras (una de cada concentración alta, media y baja de la recta de calibrado) preparadas por diferentes analistas y otras tres muestras (duplicadas) analizadas en diferentes días.

- Reproducibilidad: es la precisión que se puede obtener al analizar las muestras en diferentes laboratorios con estandarización final de la metodología de la técnica. Esta no se requiere por hacerse la precisión intermedia.

- **Especificidad.**

Se conoce por especificidad de un método analítico la capacidad del método para evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de otros componentes que puedan formar parte de la muestra, de manera natural o adicionada para la preparación de la misma. Entre otras sustancias pueden haber impurezas, productos derivados de la descomposición o degradación del analito, la matriz que forma la muestra, restos de disolventes. Por lo indicado anteriormente, la especificidad describe la capacidad del método analítico para medir exacta y específicamente el principio activo sin interferencias de posibles sustancias de la muestra.

Como el método que se valida va a emplearse para analizar un analito (vitamina C) en plasma, se utiliza una solución estándar de ácido ascórbico, una solución de plasma blanco y por último una mezcla de plasma con una concentración determinada de vitamina C. Se analizan las tres muestras para comprobar que ni el plasma, ni el DTT, ni el MPA producen interferencias con la vitamina C.

- **Límite de detección y límite de cuantificación.**

En un método analítico, el límite de detección es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada por el sistema de medida. Esta cantidad aunque se puede analizar, en ocasiones, no se puede cuantificar ya que los ruidos de fondo de los instrumentos de medida no permiten una cuantificación fiable.

El cálculo se realiza como el coeficiente entre 3,3 veces la desviación estándar (σ) entre la pendiente de la recta (s):

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{s}$$

El límite de cuantificación es la cantidad mínima de analito que puede ser analizada dentro de una muestra y a la vez puede determinarse cualitativamente con la precisión y la exactitud adecuada. El límite de cuantificación se emplea en ensayos cuantitativos, principalmente para ensayos sobre impurezas o productos de degradación, expresándose como concentración del analito en estudio.

$$LD = \frac{10 \times \sigma}{s}$$

- **Robustez.**

Con la robustez de un método se cuantifica la capacidad del mismo para poder analizar las muestras de manera constante e inalterada se modifiquen las condiciones de análisis de manera débil o con grandes variaciones.

La robustez en un método analítico se puede evaluar por cambios en todas las variables analíticas del método validado (HPLC) como son:

- Temperatura: las variaciones por mínimas que sean pueden variar en gran magnitud la capacidad analítica del HPLC. Estas variaciones se dan por el aumento o la disminución de la densidad de las fases móviles y de las muestras cuando son inyectadas en el sistema. Cuando se eleva la temperatura la densidad es menor y por tanto se generan presiones inferiores en el interior de las columnas analíticas. Por el contrario, si la temperatura disminuye se generan aumentos en la presión de la columna analítica y por tanto se produce la salida de manera mucho más rápida de las muestras. Estas variaciones pueden generar que no se resuelvan correctamente los picos dando interferencias entre los componentes de las muestras con los consiguientes errores de análisis.
- Componentes de la fase móvil o estacionaria. Las variaciones de las fases pueden generar variaciones en los análisis derivados del cambio de la lipofilia o la hidrofilia del medio. Así los análisis de sustancias hidrofílicas con fase móvil lipófila y fase estacionaria hidrófila retienen por más tiempo los analitos pudiendo generar resoluciones muy diferentes a si la fase móvil fuera hidrofílica y la estacionaria lipófila.
- Acidez o alcalinidad: dependiendo de las características ácidas o básicas de la muestra y de las fases empleadas se dan ionizaciones o neutralizaciones de los analitos. Los cambios iónicos de los analitos pueden influir por generar una menor o mayor resolución por aumentar o disminuir el frente de la muestra a través de la columna analítica.

3.2.3.3. Ajuste de la dosis oral a administrar y modificación de los perfiles de absorción.

- Ajuste de la dosis oral a administrar.

El objetivo de este estudio es determinar la dosis de vitamina C que se debe administrar por vía oral a los ratones para poder tener unos niveles plasmáticos que sean cuantificables por el método de HPLC en todo el rango de tiempos de estudio. Estas pruebas iniciales han sido esenciales ya que la vitamina C es un analito que aparece en la muestra en condiciones fisiológicas y además no se absorbe en su totalidad por la vía oral. La absorción se disminuye por degradaciones en el intestino, pérdidas por heces o la variabilidad entre las concentraciones interindividuales.

Se realizaron ensayos a dosis de 500 mg/kg y de 100 mg/kg tomando muestras a diferentes tiempos de distribución. Las muestras se prepararon y acondicionaron de la misma manera que en el ensayo y se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas.

- Modificación de los perfiles de absorción.

Los perfiles de absorción de la vitamina C, en un principio, deben de modificarse y variar por absorberse por medio de transporte activo a nivel de los bordes en cepillo de los enterocitos. Las variaciones en la absorción derivarán, por tanto, por el daño generado a nivel de las vellosidades, que al ser sesgadas por medio de la ebulina-f quedan como estructuras atrofiadas con pérdida de la función biológica.

Jiménez y colaboradores (2013b) estudiaron la modificación de la absorción oral de la vitamina B₆ como consecuencia de la administración

parenteral de dosis subletales (10 mg/kg) de nigrina b, una lectina inhibidora de ribosomas obtenida de la corteza de *Sambucus nigra* L. (Figura M4).

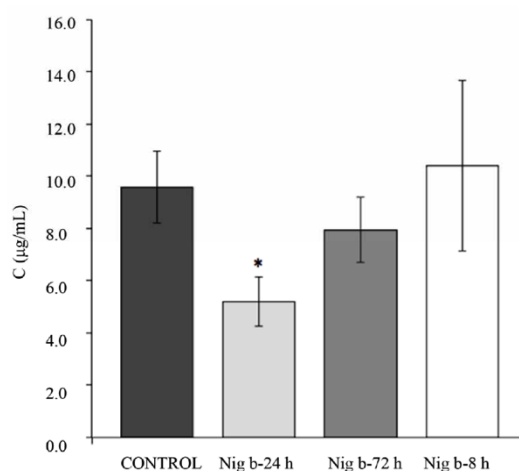


Figura M4. Absorción de vitamina B₆ tras administrar una dosis subletal de nigrina b. Se observa una disminución en la absorción de vitamina B₆ tras la administración intraperitoneal de nigrina-b a las 24 horas tras la inoculación existiendo una recuperación a los 8 días la plena funcionalidad de la absorción de la vitamina B₆

El modelo de daño-regeneración intestinal causado por nigrina b genera un descenso estadísticamente significativo de la absorción de la vitamina B₆ a las 24h, en comparación con el grupo control. A las 72 h se aprecia una tendencia de recuperación de la absorción que si se compara con el grupo de 8 días no es significativa. Además se observa al comparar el grupo de 8 días con el control la recuperación de la absorción de la vitamina en estudio.

3.2.3.4. Ajuste de los datos y tratamiento farmacocinético de los mismos.

En el análisis farmacocinético de la disposición de fármacos en el organismo, los tejidos se dividen en compartimentos según su grado de irrigación y afinidad. En estos compartimentos se considera que la distribución del fármaco es instantánea y homogénea. De esta manera se generan modelos farmacocinéticos monocompartimentales, bicompartimentales o policompartimentales en la que se establecen equilibrios de distribución entre los diferentes compartimentos regidos por microconstantes y en los que la eliminación del fármaco se produce desde el compartimento central o compartimento 1 por biotransformación y/o excreción renal regida por una constante de eliminación (K_{10}) habitualmente lineal y de primer orden. Esta aproximación genera ecuaciones matemáticas poliexponenciales que pueden estimarse mediante regresión no-lineal ponderada al tratarse de datos con error no constante.

Según el protocolo descrito en el apartado 3.2.3.1., tras la administración oral de un bolo único de vitamina C, se han obtenido las concentraciones plasmáticas a diferentes tiempos. Los perfiles plasmáticos resultantes, se han ajustado a diferentes modelos farmacocinéticos con el programa estadístico SIMFIT-EXFIT, obteniéndose los mejores resultados de ajuste con el modelo bicompartimental. En dicho modelo se asume que existe un compartimento central (sangre y tejidos muy perfundidos) y un compartimento periférico de lenta distribución (tejidos de baja perfusión).

For best-fit 2-exponential function

Parameter	Value	Std. error	.. 95% Con. Lim. ..	p
A(1)	4.745E+00	8.84E-01	2.95E+00 6.54E+00	0.000
A(2)	-4.745E+00	(fixed)		
k(1)	1.617E-03	2.41E-03	-3.30E-03 6.53E-03	0.508 *
k(2)	1.734E-01	1.73E-01	-1.79E-01 5.26E-01	0.324 *
AUC	2.908E+03			

AUC is the area under the curve from t = 0 to t = infinity

Initial time point (A) = 0.000E+00

Final time point (B) = 1.200E+02

Area from t = A to t = B = 4.903E+02

Average over range (A,B) = 4.085E+00

Analysis of residuals: SSQ = 9.739E+01

Est. average % coeff.var. = 41.506

R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.164

Largest Abs.rel.res. = 115.71 %

Smallest Abs.rel.res. = 0.00 %

Average Abs.rel.res. = 33.94 %

Abs.rel.res. in range 10-20 % = 13.89 %

Abs.rel.res. in range 20-40 % = 36.11 %

Abs.rel.res. in range 40-80 % = 36.11 %

Abs.rel.res. > 80 % = 2.78 %

No. res. < 0 (m) = 18

No. res. > 0 (n) = 17

No. runs observed (r) = 15

P(runs =< r : given m and n) = 0.151

5% lower tail point = 13

1% lower tail point = 11

P(runs =< r : given m plus n) = 0.196

P(signs =< least no. observed) = 1.000

Durbin-Watson test statistic = 1.752

Shapiro-Wilks W (wtd. res.) = 0.962

Significance level of W = 0.251

Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.708E+02 (1.702E+02)

Verdict on goodness of fit quite good

Figura M5. Detalle del informe generado por el programa SIMFIT-EXFIT conforme al modelo bicompartimental extravasal.

El programa genera los parámetros del modelo optimizados y el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) entre tiempo 0 e ∞ . El AUC es un parámetro farmacocinético muy utilizado para análisis modelo-independiente o para cálculos de biodisponibilidad y bioequivalencia. Junto con el valor óptimo de cada parámetro del modelo seleccionado el programa incluye el error estándar del parámetro, los límites de confianza al 95% y la probabilidad (p) de que el parámetro sea redundante. Además genera la matriz de correlación de los parámetros y toda la estadística asociada al ajuste.

En el presente estudio la vitamina C se administra en solución por vía oral. Por tanto se deben considerar que existen fenómenos de absorción pero no de liberación. En cualquier caso, se ha de considerar que la concentración plasmática dependerá de la dosis administrada y de las posibles degradaciones en el aparato digestivo (pH, enzimas, bacterias, efecto de primer paso intestinal, eliminación por heces) e hígado (efecto de primer paso hepático).

El modelo farmacocinético más habitual al que se ajusta un fármaco tras su administración por las rutas de administración convencionales (oral, dérmica, etc.) es el monocompartimental extravasal (Figura M6).

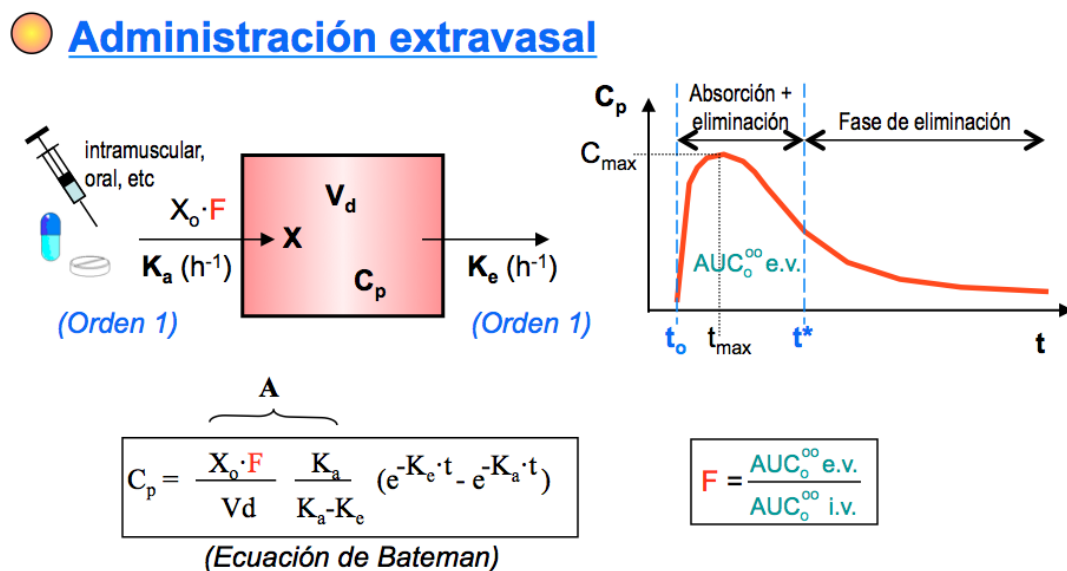


Figura M6. Esquema y relación de constantes en el modelo farmacocinético monocompartimental extravasal

Así en un instante dado la cantidad de fármaco en sangre será proporcional a la velocidad de incorporación menos la velocidad de eliminación, esto es:

$$\frac{dX_c}{dt} = \text{entra} - \text{sale}$$

$$\frac{dX}{dt} = K_a X_a - K_e X$$

Por su parte, la cantidad de fármaco en el lumen intestinal será directamente proporcional a la dosis administrada y a la constante de incorporación al compartimento central. En cualquier caso se ha de considerar que el proceso de absorción y eliminación se rigen conforme a cinéticas de orden 1 pero no transcurren a la misma velocidad. Integrando la expresión anterior teniendo en cuenta todas estas premisas, y dividiendo por el volumen de distribución, para trabajar con concentraciones, la ecuación quedaría de la siguiente manera:

$$C = \frac{X_0}{V_d} \frac{K_a}{K_a - K_e} (e^{-K_e t} - e^{-K_a t})$$

En esta ecuación se asume que se absorbe la totalidad de la dosis administrada y como se ha comentado anteriormente, esto no es posible. Por tanto, es necesario introducir en la ecuación el factor de absorbabilidad F, que no es más que la biodisponibilidad en magnitud en tanto por uno.

$$C = \frac{F \cdot X_0}{V_d} \frac{K_a}{K_a - K_e} (e^{-K_e t} - e^{-K_a t}) \xrightarrow{A = \frac{F \cdot X_0}{V_d} \frac{K_a}{K_a - K_e}} C = A \cdot (e^{-K_e t} - e^{-K_a t})$$

Esta es la denominada ECUACIÓN DE BATEMAN. Este tipo de expresión es la que siguen reacciones químicas en cadena. En el caso de las soluciones orales, la constante de absorción es mayor que la constante de eliminación. Sin embargo, a medida que el fármaco se va incorporando al compartimento central, el proceso de absorción se va ralentizando pudiéndose despreciar matemáticamente, por lo que la ecuación de Bateman quedaría: $C = A \cdot e^{-K_e t}$; tomando logaritmos,

$$\ln C = \ln A - K_e \cdot t.$$

Esto es una recta de la que podemos obtener la constante de eliminación por la pendiente y el valor A de Bateman a partir de la ordenada en el origen (Figura M7). El resto de parámetros de la ecuación son inferidos por el paquete estadístico mediante retroproyección.

Para determinar el $C_{máx}$ se realiza la primera derivada de la ecuación de Bateman y cuando dC/dt sea 0 estaremos en $t_{máx}$:

$$dC = A(-K_e) e^{-K_e \cdot t} dt - A(-K_a) e^{-K_a \cdot t} dt; \quad dC/dt = A (K_a e^{-K_a \cdot t} - K_e e^{-K_e \cdot t})$$

$$K_a e^{-K_a \cdot t_{\max}} - K_e e^{-K_e \cdot t_{\max}} = 0; \quad K_a e^{-K_a \cdot t_{\max}} = K_e e^{-K_e \cdot t_{\max}}; \quad \frac{K_a}{K_e} = \frac{e^{-K_e t_{\max}}}{e^{-K_a t_{\max}}}$$

$$K_a/K_e = e^{-K_e \cdot t_{\max} + K_a \cdot t_{\max}}; \quad \ln K_a/K_e = -K_e \cdot t_{\max} + K_a \cdot t_{\max};$$

$$\ln K_a/K_e = t_{\max} (K_a - K_e);$$

$$t_{\max} = \frac{\ln\left(\frac{K_a}{K_e}\right)}{K_a - K_e}$$

Es decir el t_{\max} sólo depende de las constantes, es independiente de la biodisponibilidad y de la dosis.

Para determinar C_{\max} se sustituye el t_{\max} en la ecuación de Bateman:

$$C_{\max} = A \cdot e^{-K_e \cdot t_{\max}} - A \cdot e^{-K_a \cdot t_{\max}}$$

Por tanto el C_{\max} depende de las constantes, de la dosis y de la biodisponibilidad.

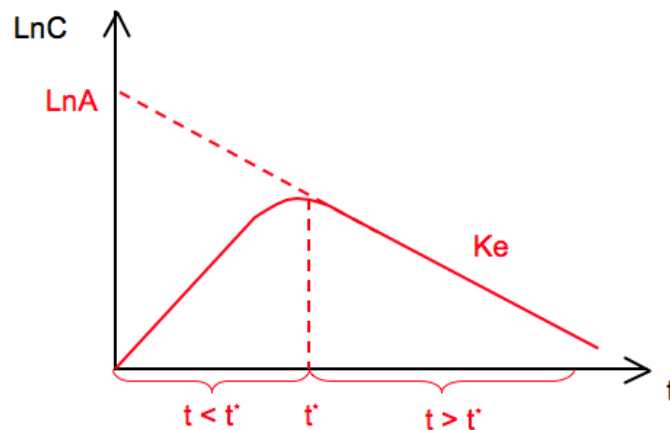


Figura M7. Determinación de la K_e y A . t' es el tiempo límite en el cual es posible despreciar matemáticamente la exponencial de absorción pero no la de eliminación en la ecuación de Bateman

3.2.4. Influencia de la administración IP de dosis subletales de ebulina-f en la cinética de absorción oral de glucosa.

3.2.4.1. Protocolo del estudio.

En el estudio de modificación de los perfiles de absorción de glucosa tras la administración de ebulina-f se siguió el protocolo:

- Pesado de los animales (peso a $t=0$), marcaje y administración intraperitoneal de una dosis subletal única de ebulina-f (2,2 mg/kg). La inoculación no se administra al grupo control.
- Mantener separados por grupos en jaulas individuales a los animales en condiciones óptimas durante el tiempo predeterminado mediante el diseño experimental. Tras este periodo de tiempo se procedió de la siguiente manera:
 - Retirada del alimento sólido 4h antes de la administración oral de glucosa para asegurar niveles basales.
 - Transcurrido el tiempo de ayuno, realizar la determinación de niveles plasmáticos de glucosa basales. Para ello se extraerá un volumen de sangre aproximado de 0,2 mL por punción retro-orbital y se analizará en un glucómetro Accu-Chek[®] según las instrucciones del equipo.
 - Administración de una dosis intragástrica de glucosa de 2000 mg/kg mediante una aguja de punta roma de administración oral forzada de 22G. Para ello, ajustar el volumen de administración de una solución acuosa de glucosa al 60% al peso del animal, siendo el volumen de administración próximo a 0,1 mL.

- Tras su administración oral, determinar los niveles plasmáticos a los 5, 10, 20, 30, 60 y 90 minutos siguiendo la misma metodología indicada para la determinación de niveles basales de glucosa. Los tiempos han sido determinados según la bibliografía consultada y mediante un ensayo previo en nuestras condiciones de experimentación.

3.2.4.2. Técnica analítica por glucometría y adecuación al protocolo.

En análisis de los niveles de glucosa se ha realizado mediante un glucómetro Accutrend® de laboratorios Roche equipado con tiras diagnósticas Accu-Check®. A pesar de que estos equipos han sido desarrollados para la determinación de niveles plasmáticos en humanos, diversos autores han utilizado dichos sistemas en la determinación de niveles de glucosa en animales de experimentación (Dahlhoff y cols., 2009; Veslemøy y cols., 2012; Penhoaty cols., 2014; Kim y cols., 2014).



Figura M8.- Detalle del equipo empleado para la determinación de glucosa plasmática.

El sistema analítico se basa en que la enzima de la tira reactiva, glucosa deshidrogenasa junto con una coenzima presente en el medio de reacción, convierte la glucosa de la muestra de sangre en glucuronolactona. Esta reacción crea una corriente eléctrica que el medidor traduce en un valor de glucemia (Figura M9).

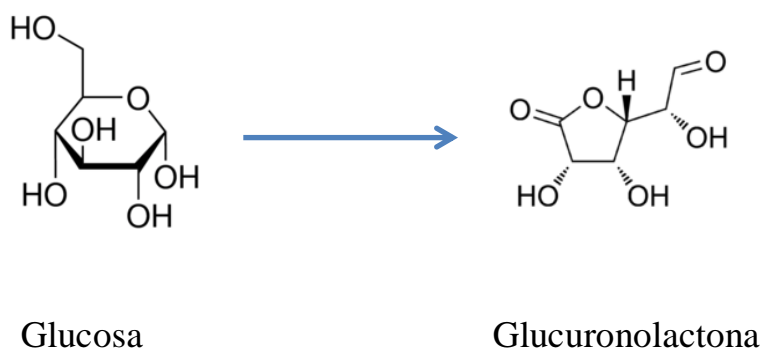


Figura M9.- Transformación de la glucosa en glucuronolactona mediado por el enzima glucosa deshidrogenasa.

El sistema de medida tiene un rango de lecturas que va desde los 10 mg/mL a los 600 mg/mL con una serie de limitaciones, que podrían generar interferencias en el presente estudio, como son:

- Administración de sustancias interferentes. Los productos que contengan o que puedan metabolizarse generando maltosa. Por ejemplo la Icodextrina, Abatacept o el Tositumomab. O la administración de productos que contengan altas concentraciones de galactosa.
- Galactosemia: concentraciones sanguíneas de galactosa mayores de 10 mg/mL pueden generar errores de medida dando unos niveles de glucosa mayores.

- Hematocrito: los niveles de hematocrito con valores de <20% o >65% para valores de glucemia <200 mg/mL o valores <20% o >55% para valores de glucemia >200 mg/mL pueden producir desviaciones en las medidas de glucemia.
- Ácido ascórbico: la administración intravenosa de ácido ascórbico que devengue en concentraciones mayores a 3 mg/mL genera resultados sobrevalorados de glucemia.

El método empleado para extraer la sangre completa se ha basado en la técnica de extracción retro-orbital (Figura M10). La técnica tiene por fundamento la penetración, con una pipeta Pasteur de cuello largo o un capilar de vidrio, en la zona retro-orbital del ojo. Los pasos para la extracción son:

- Anestesia del animal hasta alcanzar el plano quirúrgico. Esta anestesia se alcanza mediante la aplicación de Isoflurano gas a los animales dentro de una cámara de gas hermética. Debido a la potencia del anestésico se debe aplicar el gas durante un periodo corto de tiempo (10 a 20 segundos) ya que si se aplica durante más tiempo se produciría la muerte por sobredosis.
- Colocación de la punta de una pipeta Pasteur de cuello largo o un capilar de vidrio sobre la zona retro-orbital.
- Ejercer presión ligera sobre la zona y realizar movimientos de giro para romper el epitelio y el plexo capilar.
- Extraer levemente la pipeta o el capilar hasta observar que se produce el ascenso de la sangre completa.

- Colocar la muestra sanguínea en el compartimento de reacción de la tira. Tras ello tratar al animal pertinentemente para su correcta recuperación y devolverlo a la jaula.

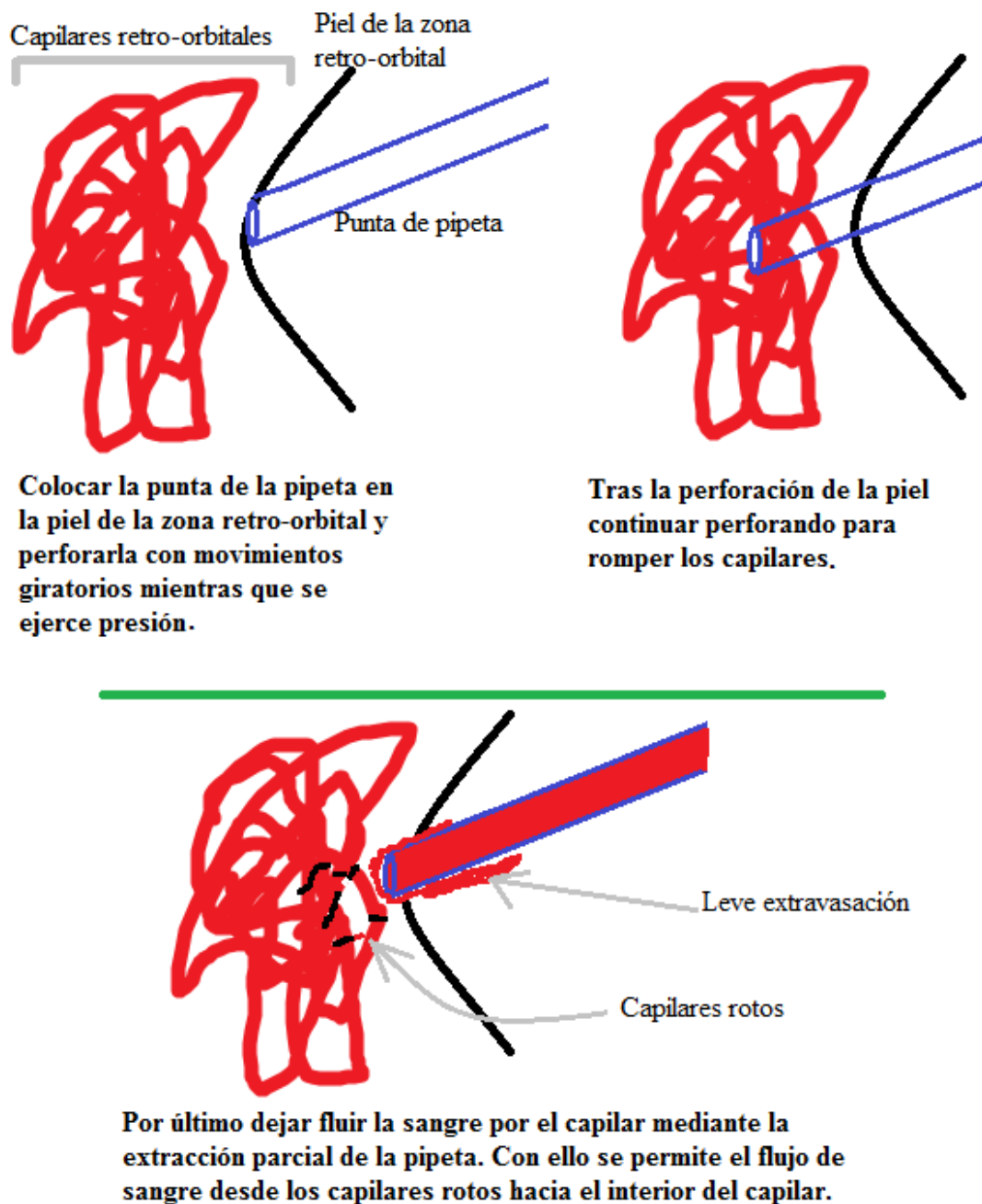


Figura M10. Esquema ilustrado de la técnica de sangrado retroorbital.

3.2.4.3. Ajuste de la dosis oral a administrar y modificación de los perfiles de absorción.

La dosis y el tiempo de ayuno previo a la administración del bolo de glucosa se determinó en base a la bibliografía consultada (Tabla M2):

Tabla M2. Tiempo de ayuno, dosis y tiempos de muestreo en estudios de glucemia en ratones Swiss

Autor	Ayuno (h)	mg/kg	Tiempos toma (min)
Vesleøy y cols. (2009)	12 (noche)	2000	0, 30, 60, 90, 120, 180
Mbikaya y cols. (2010)	12 (noche)	1500	0, 15, 30, 60, 120
Young y cols. (2010)	12 (noche)	2000	0, 30, 60, 120, 180
Luo y cols. (2007)	4	4000	0, 5, 15, 30, 60, 120
Xu y cols. (2011)	15 (noche)	1500	0, 15, 30, 60, 120

- Dosis de administración: 2000 mg/kg ya que es una dosis intermedia, dentro del rango de la bibliografía consultada. Y también porque esta dosis se puede administrar como un bolo oral único con un volumen final cercano a 0,1 mL para evitar regurgitaciones.
- Tiempo previo de ayuno de 4 horas para conseguir el estado basal de glucemia. No se utilizó el ayuno de 12 horas porque los animales que se tratan con ebulina-f sufren daños intestinales, con el estado de desnutrición que se deriva del mismo. Así en caso de poder tener unos niveles de glucemia basales con las 4 horas de ayuno se evita un mayor estrés y daño a los animales utilizados.
- Los tiempos de muestreo para el ensayo previo se fijaron en: 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos.

3.2.4.4. Ajuste de los datos y tratamiento farmacocinético de los mismos.

La administración de glucosa se realiza de la misma manera que con la vitamina C. Por tanto los datos se tratan como un modelo bicompartimental de distribución tras la administración oral. Los valores obtenidos se estudian con el mismo paquete informático SIMFIT-EXFIT para realizar el modelado y obtener las constantes del modelo.

3.2.5. Análisis estadísticos de los resultados.

La estadística se define como la parte de las ciencias matemáticas cuya finalidad se basa en el estudio de una determinada característica de una población, recogiendo los datos, organizándolos en tablas, representándolos gráficamente y analizándolos para sacar conclusiones, teorías o hipótesis de los datos que se han estudiado. Existen dos tipos de estadísticas según se haga el estudio sobre todos los elementos de la población o sobre un grupo de ella.

- **Estadística descriptiva:** se realiza el estudio sobre la totalidad de la población, observando una característica de la misma y calculando unos valores o parámetros que den información global de toda la población.
- **Estadística inferencial:** el estudio descriptivo se realiza sobre un subconjunto de la población llamado muestra y, posteriormente, extiende los resultados obtenidos a toda la población de individuos.

Se han mentado conceptos como población, muestra e individuo que se definen como (Triola, M. F. 2004):

- **Población:** colección completa de todos los elementos o individuos (puntuaciones, personas, mediciones, etcétera) a estudiar. Se dice que la colección es completa por estar en ella incluidos todos los sujetos que se estudiarán.
- **Muestra:** parte o segmento de la población que se escoge para el estudio estadístico sobre este sin tener que emplear o utilizar toda la población para el estudio. Se debe incidir en que esta muestra debe ser representativa de la población en su conjunto, esto es que con esta muestra queden representados todos los individuos de la población dentro del estudio estadístico que se realiza.
- **Individuo o elemento:** cada una de las personas, objetos, medidas, datos, etcétera que se van a estudiar estadísticamente y forman parte de una población (o muestra de esta población) que se analiza en un estudio estadístico.

Cuando se analiza una variable cuantitativa en una muestra se puede calcular la tendencia de la misma a agruparse en torno a un punto, empleando estadísticos tales como la media aritmética (\bar{x}), la media aritmética ponderada, la mediana, etc. Además se puede determinar la capacidad de dispersión, esto es, la variabilidad de la muestra, mediante el cálculo de la varianza, la desviación típica (s) y el coeficiente de variación. Existen diversas distribuciones de frecuencia que permiten definir la variación de una serie de medidas de varias muestras, pero la más frecuente es aquella que se ajusta a una curva de Gauss. En ella, podemos determinar, tanto su valor central (μ) como el error tipo o desviación estándar de la media (σ). En este sentido, una distribución normal se caracteriza porque el 68,27% de las observaciones que se realicen se encontrarán en el intervalo $[\mu \pm \sigma]$. De la misma forma, el 95% de las observaciones están

comprendidas en el intervalo $[\mu \pm 1,96\sigma]$, y el 99%, en el $[\mu \pm 2,58\sigma]$. Los parámetros muestrales (x y s) reflejan los de la población (μ y σ) con un margen de probabilidad. El margen de tolerancia de la población inaccesible se denomina intervalo de confianza, y a la probabilidad de que dicha población escape de él, probabilidad de error (p). Los intervalos de confianza utilizados más habitualmente son los del 5% ($p < 0,05$) y los del 1% ($p < 0,01$).

Cuando no se conoce la desviación típica de la población, σ puede estimarse desde la cuasidesviación típica de la muestra (s). Sin embargo, el cociente $(x-\mu)/(s-\sigma)$ sigue una distribución normal tipificada sólo cuando n es mayor de 30.

Para tamaños muestrales inferiores a 30 se define la variable t de Student por la siguiente expresión:

$$t = \frac{x - \mu}{s / \sqrt{n-1}}$$

Por lo tanto, el intervalo de confianza para la media que se utilizará en la presente memoria aparece definido en la siguiente expresión:

$$\boxed{x \pm t \frac{s}{\sqrt{n-1}}}$$

- Regresión lineal y correlación

Existe relación o regresión entre los valores de dos variables, si puede establecerse entre ambas una ecuación matemática que las relacione. La ecuación que mejor defina dicha relación será aquella en la que la suma de las desviaciones de todas las observaciones es nula, y el sumatorio de las distancias desde cada punto a la línea al cuadrado es mínimo.

En general, la expresión que rige una relación lineal sería la siguiente:

$$y = a + bx$$

siendo a y b dos constantes que vienen definidas por las siguientes expresiones:

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \qquad b = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}$$

Cuanto menor sea la varianza de la pendiente, mejor será la linealidad. Los límites de confianza de la pendiente se definen mediante la expresión: $b \pm tS_b$

Por otro lado se puede calcular t_{exp} , ($t_{exp} = |b| / S_b$) y establecer como hipótesis nula que $b = 0$. Un valor de $t_{exp} > t_{tab}$ es indicador de que existe regresión.

Por su parte, los límites de confianza de la ordenada en el origen, $a \pm tS_a$ nos indican si la recta pasa o no por el origen de coordenadas.

La significación estadística de la ordenada en el origen viene dada por la ecuación:

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

Si la hipótesis nula es $a = 0$ y $t_{exp} > t_{tab}$, a es distinta de 0 por lo que la recta no pasaría por el origen de coordenadas.

La correlación es un parámetro que indica la distancia de los puntos a la línea de regresión. De esta manera, el coeficiente de correlación (r) viene dado por la expresión:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 (y - \bar{y})^2}}$$

Si $r = 0$, las variables son independientes entre sí, mientras que si es ± 1 las variables están relacionadas mediante una recta ascendente o descendente respectivamente.

4. RESULTADOS.



4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EBULINA-F.

La ebulina-f para este estudio se ha extraído de dos presentaciones diferentes de frutos: los verdes frescos congelados (Barruelo del Valle-Valladolid cuya geolocalización GPS es 41° 40' 27" N 5° 04' 09" O y altitud 810 msnm) y los verdes liofilizados (Escalona-Toledo cuya geolocalización GPS es 40° 10' 15" N 4° 24' 19" O y altitud 457 msnm). Según datos oficiales de la Agencia Estatal de Meteorología, los principales indicadores climatológicos en el periodo 1971-2000 de la provincia de Valladolid serían los siguientes:

- Temperatura media anual (°C): 12,3
- Temperatura media anual de las temperaturas máximas diarias (°C): 30,4 (Julio)
- Temperatura media anual de las temperaturas mínimas diarias (°C): 0,0 (Enero)
- Precipitación anual media (mm): 435
- Número medio anual de horas de sol: 2534

Por su parte, los valores para la provincia de Toledo son los siguientes:

- Temperatura media anual (°C): 15,4
- Temperatura media mensual de las temperaturas máximas diarias (°C): 33,6 (Julio)
- Temperatura media mensual de las temperaturas mínimas diarias (°C): 1,6 (Enero)
- Precipitación anual media (mm): 357
- Número medio anual de horas de sol: 2847

Como se puede observar, las diferencias de temperatura, precipitaciones o números de horas de sol en las zonas donde se ha recolectado el material biológico son mínimas. Además el protocolo seguido para las extracciones ha sido el mismo, con los mismos reactivos, columnas, etc. Por tanto las posibles diferencias en los perfiles cromatográficos se deben únicamente a la forma de conservación (congelación del material fresco o liofilización) del material biológico de la que se parte en el inicio de la extracción.

El perfil obtenido a partir de la cromatografía de afinidad de los extractos de los frutos frescos congelados (Figura R1) muestra dos máximos de absorbancia claramente diferenciados entre las alícuotas 15-32 correspondientes a dos proteínas diferentes. Las alícuotas 15 a 32 se homogenizan y son las que se concentran mediante la celda Amicon[®] para la cromatografía de exclusión molecular a través de la columna Superdex 75[®]. En el gráfico de absorbancias (Figura R2) se muestra un primer pico (alícuotas 21 a 29) que es la SELfd y un segundo pico (no mostrado por completo) que corresponde a la ebulina-f purísima.

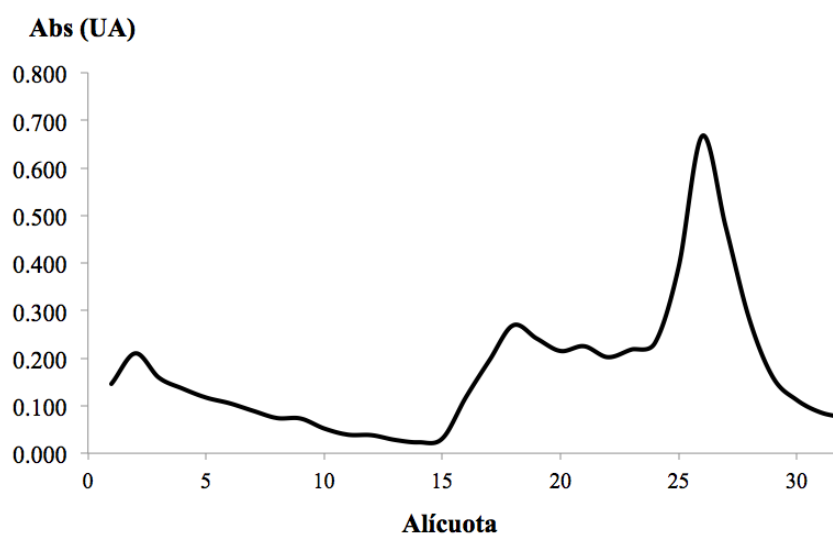


Figura R1.- Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharosa 6B.
Extracto crudo de frutos frescos verdes congelados.

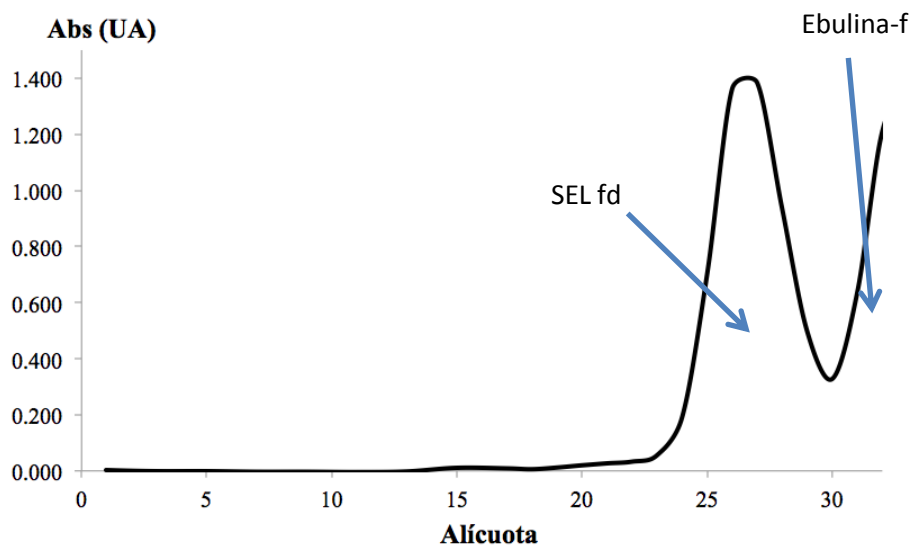


Figura R2.- Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75[®]. Extracto crudo de frutos frescos verdes congelados.

La concentración en ebulina-f (alícuotas 21-29) determinada según la metodología espectrofotométrica propuesta por Kalb y Bernlohr (1977) ha sido la siguiente ($A_{230\text{ nm}}$: 0,161; $A_{320\text{ nm}}$: 0,009; $A_{260\text{ nm}}$: 0,028):

$C_{\text{ebulina-f}}: 26,376 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$

Para evaluar la viabilidad de la proteína purificada se llevó a cabo un ensayo de hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos conforme a la metodología propuesta por Jiménez y colaboradores (2013a). El estudio se llevó a cabo a dos temperaturas, 4 °C y 24 °C; la primera de ellas es la temperatura de conservación de la preparación de ebulina una vez descongelada y la segunda, se corresponde con la temperatura media del laboratorio.

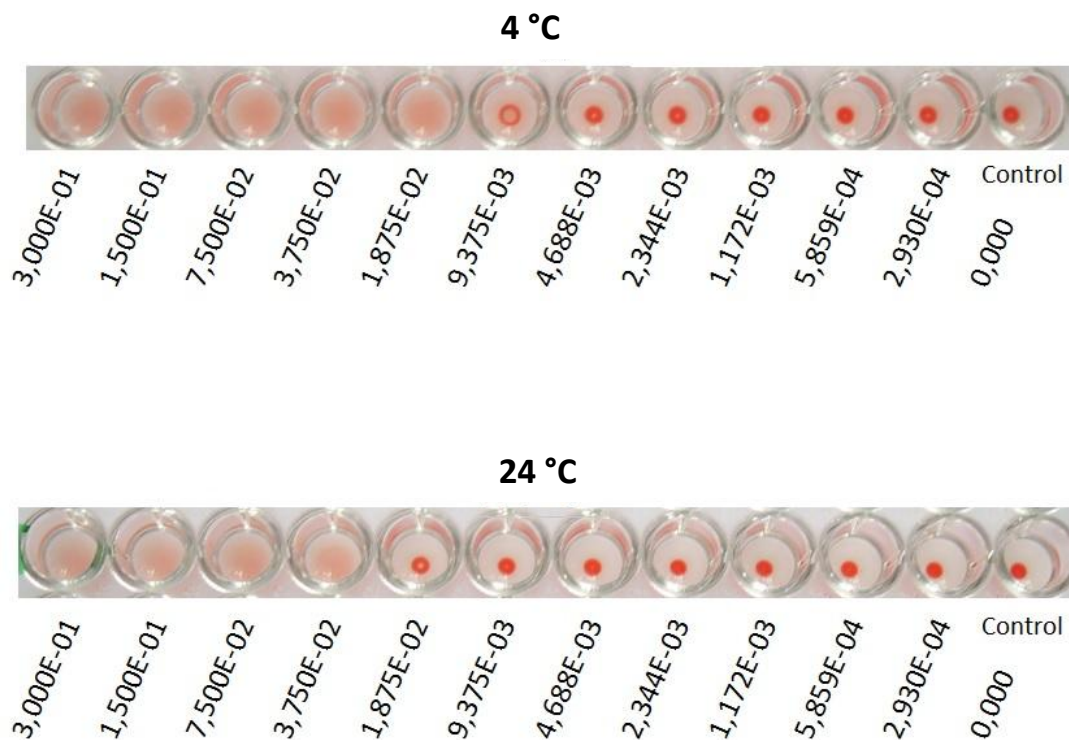


Figura R3.- Capacidad de hemoaglutinación de ebulina-f a diferentes temperaturas. Glóbulos rojos humanos 0⁺ incubados en micropocillos de fondo redondo durante 60 min a 4 °C y 24 °C. La concentración inicial de ebulina-f fue 300 µg/mL (pocillo 1) y se realizaron diluciones 1:2 sucesivas (concentración teórica bajo los pocillos). Los eritrocitos no aglutinados por la lectina, precipitan y aparecen como un pellet en el fondo del pocillo. El pocillo marcado como control, no contiene lectina.

La capacidad de hemoaglutinación de la preparación de ebulina-f empleada en la siguiente memoria es 37,5 µg/mL (24 °C) y 18,8 µg/mL (4 °C) lo cual es ligeramente superior a la obtenida por Jiménez y colaboradores (2013a) pero demuestra la viabilidad de la proteína obtenida.

La pureza se determinó mediante SDS-PAGE (Jiménez y cols., 2013a) en presencia y ausencia de mercaptoetanol.

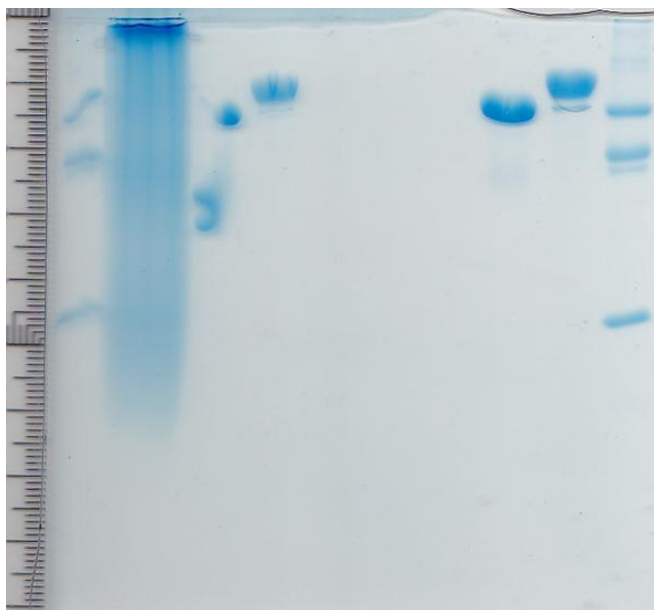


Figura R4.- SDS-PAGE de la fracción del extracto purificado de *S. ebulus* L. correspondiente a ebulina-f. En cada pocillo se dispuso 4,5 μ g de ebulina-f y 8,4 μ g SELfd respectivamente. Los marcadores, de arriba abajo, fueron los siguientes: SNA-I (Mr 136 kDa), BSA (Mr 68 kDa), Ng b (Mr 56 kDa), ovoalbúmina (Mr 45 kDa), SNAIV (Mr 30 kDa) e inhibidor de tripsina de soja (Mr 20 kDa).

Como puede apreciarse en la Figura R4, ambas proteínas se desplazan como un único y bien definido pico en ausencia de 2-mercaptoetanol, confirmando la pureza de las preparaciones. En presencia de 2-ME, ambas proteínas se disocian en dos subunidades, que en el caso de la SELfd, son idénticas y tiene un peso molecular aparente de 34 KDa.

Por su parte, el perfil obtenido tras la elución de los extractos de frutos frescos liofilizados por Sepharosa 6B (Figura R5) es el siguiente:

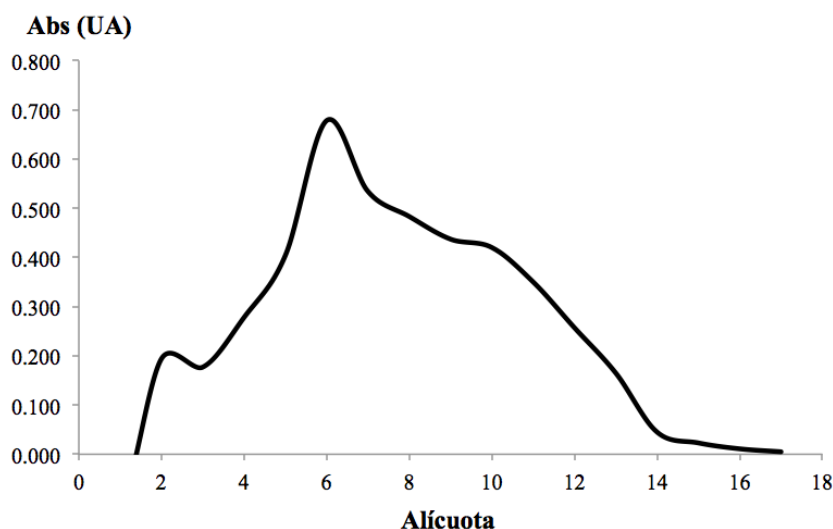


Figura R5. Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharosa 6B. Extracto crudo de frutos frescos verdes liofilizados.

Como se puede apreciar, no ha sido posible resolver la ebulina-f y la SELfd mediante cromatografía de afinidad por lo que se homogeneizó todo el extracto y se purificaron por la columna Superdex 75[®] (Figura. R4).

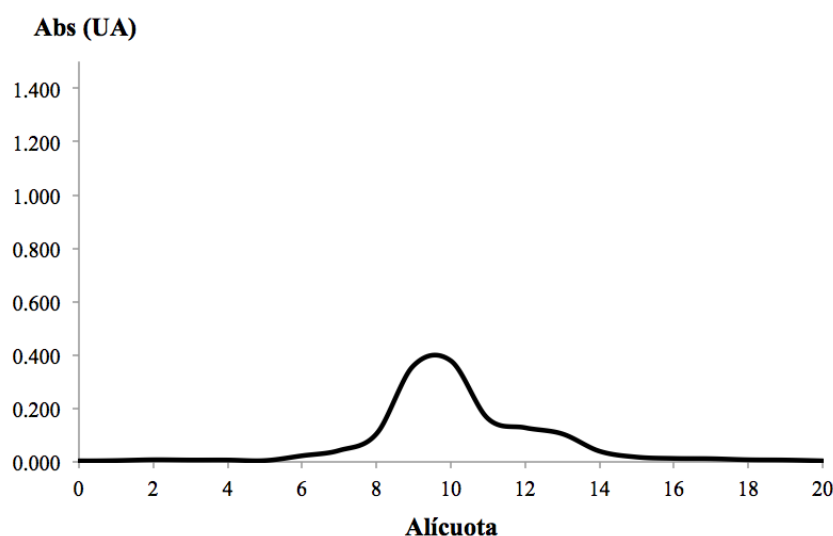


Figura R6.- Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75[®]. Extracto crudo de frutos frescos verdes liofilizados.

El comportamiento cromatográfico de ebulina-f y SELfd a partir del extracto crudo de frutos verdes congelados es equivalente al descrito previamente (Tesis Doctoral J. Tejero, 2012). Sin embargo, no ha sido posible resolver ambas proteínas a partir del extracto de frutos liofilizados debido probablemente a la imposibilidad de separar convenientemente un compuesto mucilaginoso que aparece habitualmente en las fases previas del proceso de extracción de frutos de *S. ebulus L.* Por lo tanto, sería necesario modificar y optimizar el proceso de purificación de las proteínas para poder trabajar con frutos liofilizados, estudios que se están llevando a cabo en la actualidad.

4.2. ADMINISTRACIÓN IP DE EBULINA-F.

4.2.1. Determinación de dosis subletales.

Jiménez y colaboradores (2013b) estudiaron el efecto en ratones de la administración intraperitoneal de 100 μ L de ebulina-f en tampón fosfato a diferentes dosis (2,50, 3,75 y 5,00 mg/kg de peso). El estudio histológico pormenorizado de muestras de cerebro, ojo, riñón, pulmón, intestino, páncreas, hígado, piel, testículo y ovarios tras la administración de dosis letales de ebulina-f (5,00 mg/kg), puso de manifiesto que el único tejido dañado fue el intestino. Así, a las 24 h de la administración de ebulina-f el mayor daño se observa a nivel de las células del TAC de las criptas de Lieberkühn de intestino delgado, que hace que las criptas pierdan su típica estructura de tubo y se muestren atrofiadas y con numerosas células apoptóticas. El análisis de los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier reveló que la dosis de 2,50 mg/kg no causó un daño evidente a los animales durante el tiempo de estudio.

En base a este estudio, se ha tomado como referencia la dosis de 2,50 mg/kg para generar el modelo de daño-regeneración con ebulina-f. Debido a las diferentes preparaciones de ebulina-f utilizadas, así como a pequeñas variaciones experimentales en el protocolo inicialmente propuesto, ha sido necesario ajustar la dosis subletal en algunos estudios a valores de 2,20 mg/kg. A la vista de los resultados obtenidos, la administración intraperitoneal de dosis de ebulina-f de 2,20 mg/kg de peso, muestra una mayor supervivencia en comparación con la dosis propuesta por Jiménez y cols. (2013b) de 2,50 mg/kg, y es suficiente para generar el modelo de daño-regeneración intestinal en ratón.

Los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier obtenidos en la presente memoria han sido los siguientes:

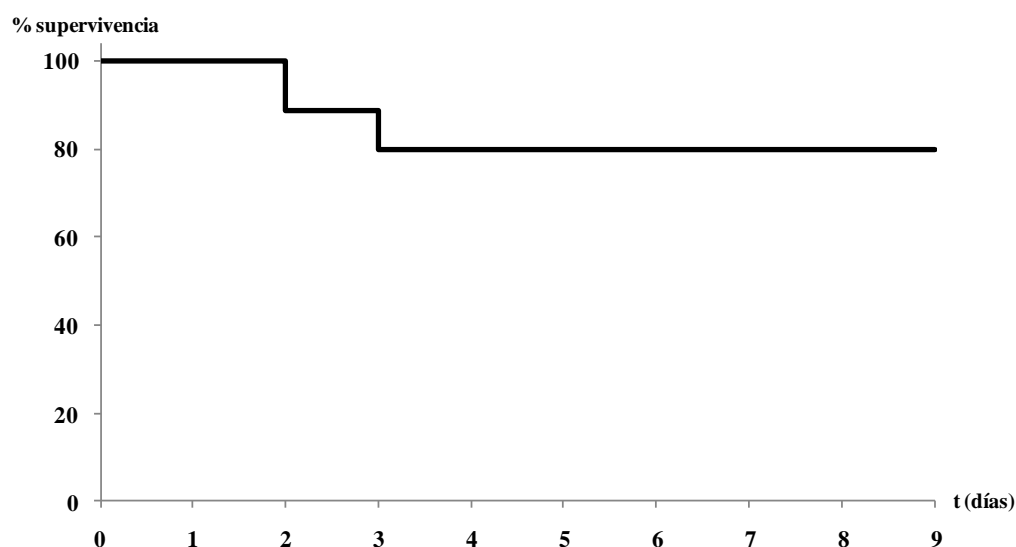


Figura R7. Gráfico de Kaplan-Meier de supervivencia tras la administración IP de 2,5 mg/kg de ebulina-f. Estudio realizado con los animales utilizados para evaluar la influencia de la administración IP de dosis subletales de ebulina-f en la absorción oral de vitamina C.

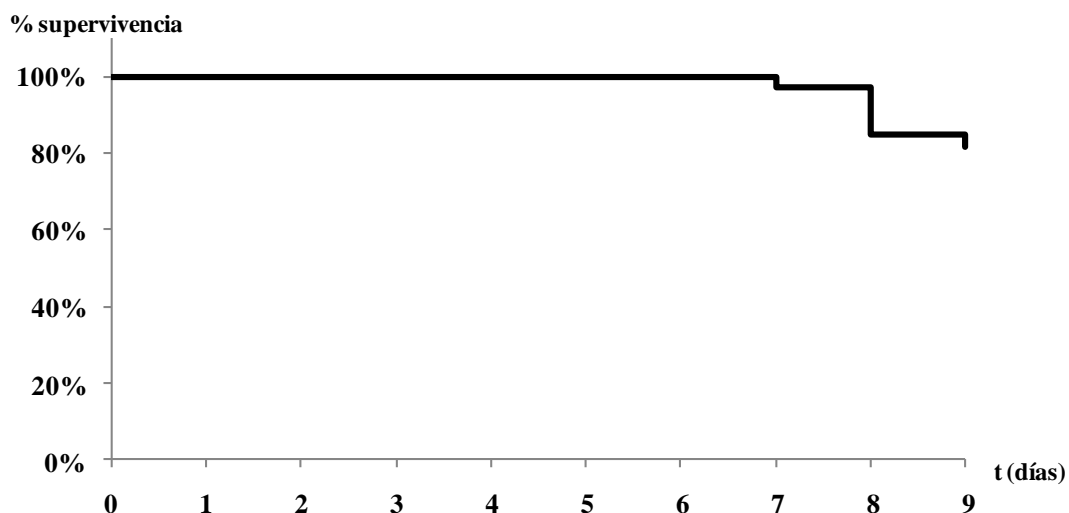


Figura R8. Gráfico de Kaplan-Meier de supervivencia tras la administración IP de 2,2 mg/kg de ebulina-f. Estudio realizado con los animales utilizados para evaluar la permeabilidad vascular.

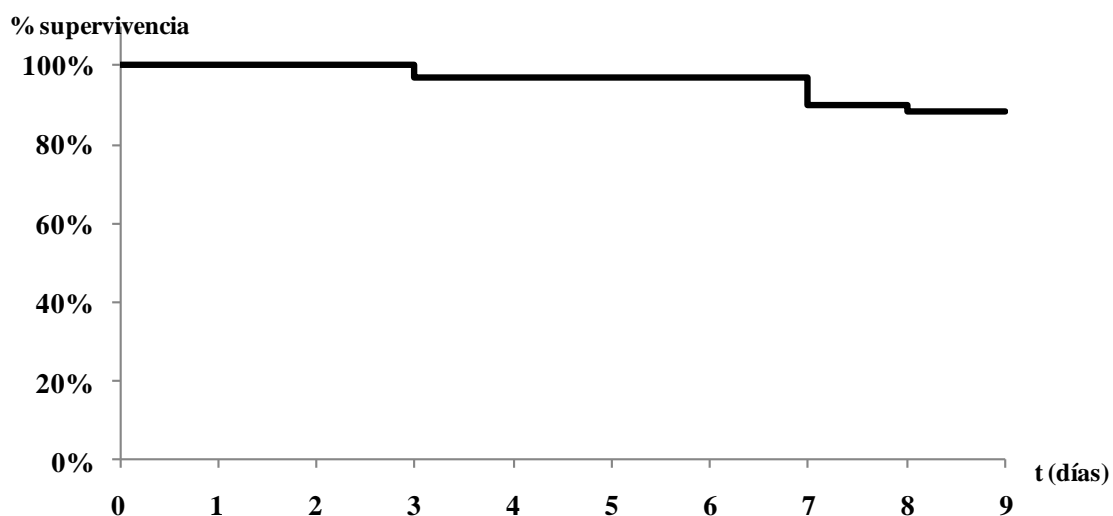


Figura R9. Gráfico de Kaplan-Meier de supervivencia tras la administración IP de 2,2 mg/kg de ebulina-f. Estudio realizado con los animales utilizados para evaluar la influencia de la administración IP de dosis subletales de ebulina-f en la absorción oral de glucosa.

4.2.2. Evolución del peso del animal respecto al tiempo.

Como ya se ha comentado, la ebulina-f a dosis subletales produce un daño específico a nivel intestinal que hace que el animal, a pesar de tener acceso ilimitado a agua y comida apenas ingiera alimento, lo que se traduce en una alteración significativa de su masa corporal. Para cuantificar dicha reducción, se ha registrado la evolución del peso de los animales incluidos en los diferentes estudios. En el siguiente gráfico se representa la evolución del peso en porcentaje respecto al peso inicial de cada individuo expresado como valor medió más-menos intervalo de confianza en función de la dosis de ebulina-f utilizada.

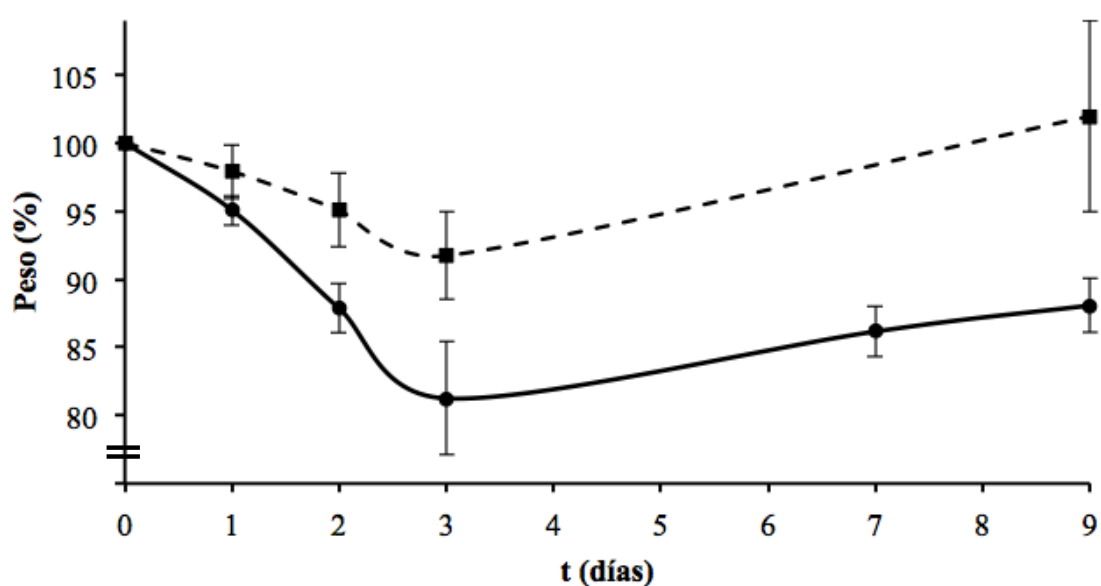


Figura R10. Gráfico de evolución de peso tras la administración IP de ebulina-f. Línea continua y como marcador un círculo, dosis de ebulina-f de 2,2 mg/kg de peso; línea discontinua y como marcador un cuadrado, dosis de ebulina-f de 2,5 mg/kg de peso.

Los resultados de los pesos indican que tanto los animales tratados con dosis de ebulina-f de 2,2 mg/kg como los tratados con dosis de 2,5 mg/kg tienen una tendencia a la disminución del peso debido al estado patológico inducido durante los primeros días del estudio, observándose posteriormente una tendencia a la recuperación del peso inicial. Las variaciones en el peso de los animales se justifican con el estado físico y fisiológico de los animales. Inmediatamente tras la inoculación y hasta que no transcurren las primeras 24 horas los animales mantienen el aspecto fisiológico de animal sano (comen, beben, mantienen actividad física, se relacionan con el resto de animales de la jaula). Desde las 24 horas tras el tratamiento y hasta las 72 horas el estado del animal se debilita quedándose con aspecto de animal enfermo o dañado (prácticamente inmóvil, apático, no se alimenta, no ingiere líquidos, aparece corcova dorsal). Ninguno de los animales ensayados presenta diarrea. Tras las 72 a 96 horas, después del tratamiento, los animales comienzan a recuperar el estado fisiológico de manera lenta y comienza a poderse observar como ingieren de nuevo alimentos y bebidas casi de la misma manera que antes del tratamiento.

Se observan diferencias estadísticamente significativas en la evolución del peso en función de la dosis utilizada. Así con la dosis de 2,5 mg/kg, el porcentaje de peso mínimo observado es de un 92% a los tres días, y la recuperación de peso al finalizar el estudio es completa. Por su parte, con la dosis de 2,2 mg/kg la máxima reducción de peso, aproximadamente un 20% del peso inicial, se observa también a los tres días de la administración de la ebulina. A partir de este punto, los animales comienzan a recuperar peso lentamente, de tal manera, que al finalizar el ensayo, el peso medio es un 15% inferior al peso inicial. Las variaciones en los resultados, se deben fundamentalmente a los distintos protocolos (tiempo de ayuno, frecuencia de muestreo, etc.) empleados en los estudios.

4.2.3. Resultados del estudio de permeabilidad vascular.

El objetivo de este estudio es determinar si la administración intraperitoneal de dosis subletales de ebulina-f en ratones, afecta a la permeabilidad vascular del epitelio intestinal y por tanto, las posibles modificaciones provocadas en la absorción de los dos xenobióticos que se evaluarán en el modelo, vitamina C y glucosa, son debidos a una discontinuidad de la barrera intestinal. Tras la administración intravenosa del azul de Evans, éste debido a su elevado peso molecular, es capaz de distribuirse por todo el aparato circulatorio y líquido intersticial sin acceder a tejidos. Se ha descrito que sólo en los tejidos que tengan dañada su permeabilidad debería aparecer tinción (Ogawa y cols., 2002).

Según el protocolo descrito en el subapartado 3.2.2.3. dentro del bloque de “Materiales y métodos”, tras la administración de ebulina-f y el sacrificio de los animales a los diferentes tiempos de estudio, se procede a la excisión quirúrgica del aparato intestinal completo y a la extracción del azul de Evans en dimetilformamida. La absorbancia determinada espectrofotométricamente en cada extracto, es contrastada frente a una recta de calibrado previamente realizada (Figura R11).

La concentración de azul de Evans existente en las diferentes porciones del aparato digestivo de los grupos de animales ensayados (control, 24 h, 48 h, 72 h y 9 días) se encuentra representado en el histograma correspondiente a la Figura R12.

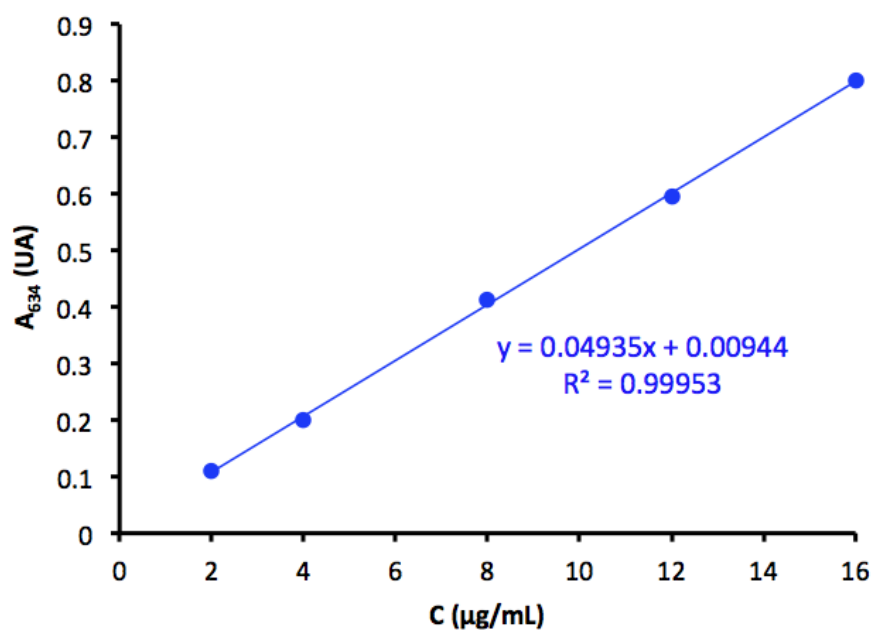


Figura R11. Recta de calibrado del colorante azul de Evans en dimetil formamida (DMF). El coeficiente de correlación muy próximo al valor 1 muestra una adecuada linealidad en el intervalo ensayado.

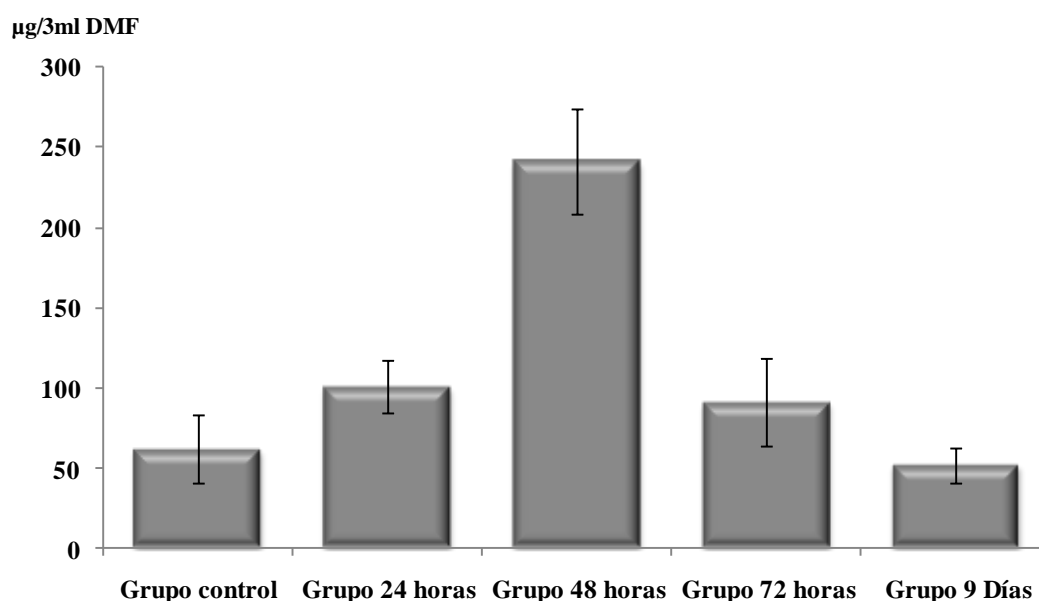


Figura R12. Concentración de azul de Evans en el aparato digestivo de los diferentes grupos ensayados (Control, 24 h, 48 h, 72 h y 9 días). Valor medio más menos desviación estándar.

En el transcurso de las primeras 24 horas se observa que entre el grupo control y el grupo 24 horas hay una tendencia hacia el incremento de la concentración de azul de Evans y por tanto del daño intestinal, si bien las diferencias entre ambos grupos no son estadísticamente significativas.

A las 48 horas de la administración intraperitoneal de ebulina-f la concentración tisular de azul de Evans es máxima, casi cinco veces superior a la concentración media obtenida en el grupo control y más de dos veces y media respecto al grupo de 24 h. En este momento se genera el máximo daño intestinal coincidiendo con el periodo de tiempo donde los animales se muestran mucho más afectados y con el menor peso.

El inicio de la recuperación del daño intestinal se observa a las 72 horas tras el tratamiento. En este momento del ensayo se demuestra una disminución significativa de la cantidad tisular de azul de Evans, respecto a las cantidades tisulares del grupo de 48 horas. La cantidad de azul de Evans en el aparato digestivo es similar a la obtenida en el grupo de 24 horas, de hecho, al comparar ambos grupos, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

Por último a los 9 días tras el tratamiento se produce una tendencia a la disminución de la cantidad de azul de Evans, respecto al grupo de 72 horas. En este grupo, los valores medios de concentración de azul de Evans en tejido, son muy similares a los obtenidos en el grupo control, por lo que atendiendo exclusivamente a estos resultados se podría afirmar que se ha recuperado la estructura gastrointestinal.

Conforme al protocolo previamente descrito, en este estudio se ha determinado además el peso y la longitud de las diferentes porciones del aparato intestinal tras su excisión quirúrgica (Figuras R13-R15). En estudios previos de nuestro equipo de investigación con el modelo de daño-

regeneración tras la administración IP de dosis subletales de nigrina b, se ha observado una reducción de ambos parámetros en función del tiempo.

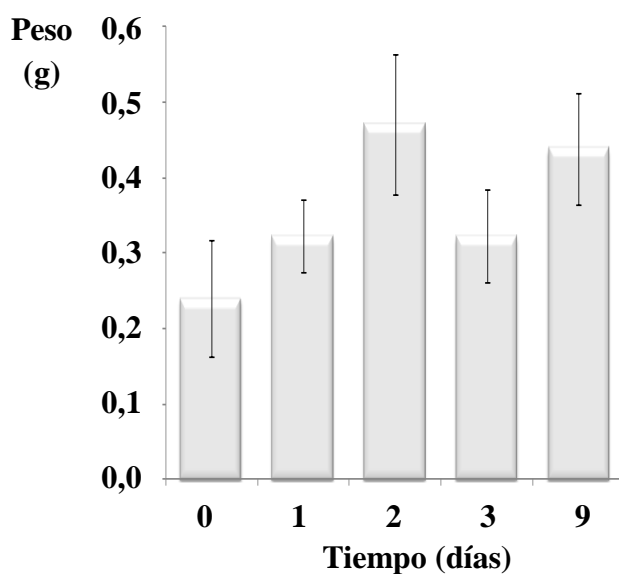


Figura R13. Peso del estómago tras la administración IP de ebulina-f.

Valor medio más-menos desviación estándar

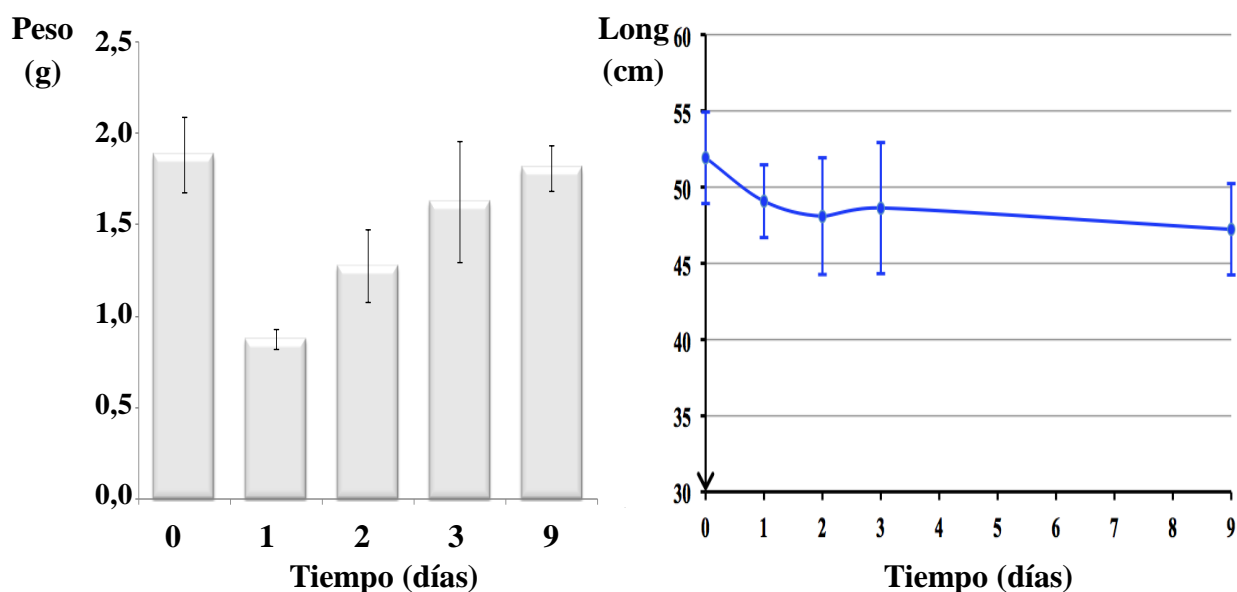


Figura R14. Peso (izquierda) y longitud (derecha) del intestino delgado tras la administración IP de ebulina-f. Valor medio más-menos desviación estándar

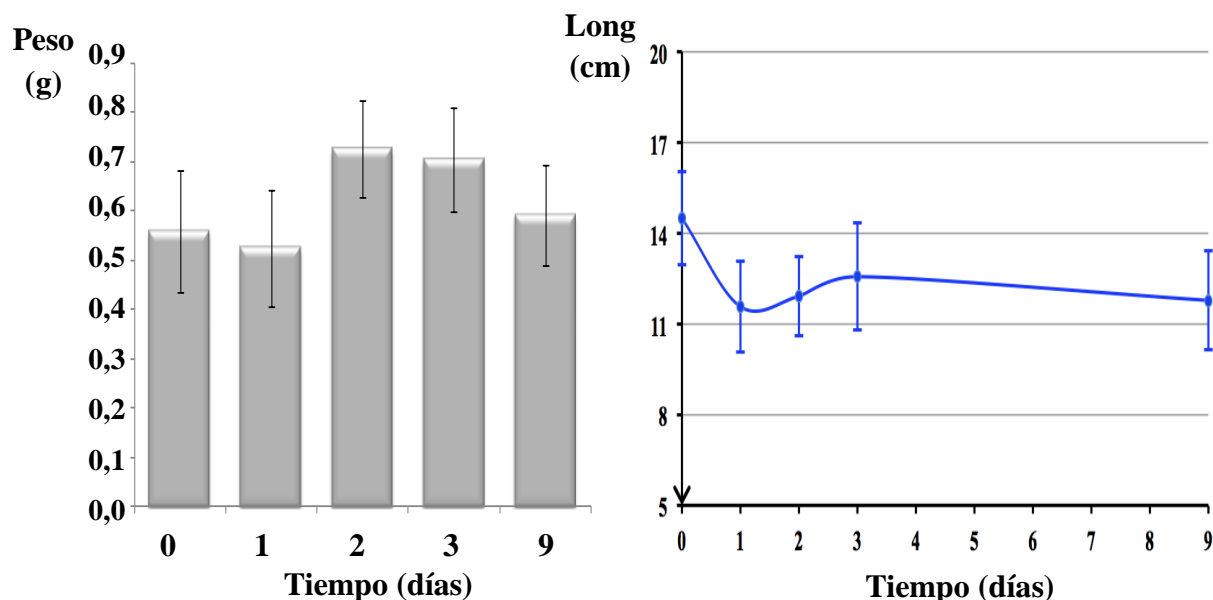


Figura R15. Peso (izquierda) y longitud (derecha) del intestino grueso tras la administración IP de ebulina-f. Valor medio más-menos desviación estándar

La evaluación del peso del estómago tras la administración IP de dosis subletales de ebulina-f muestra un valor máximo a las 48 h de la administración, un descenso a valores comparables a los obtenidos a las 24 h y un repunte a los 9 días. Las diferencias observadas entre los resultados a las 48 h y 9 días no son estadísticamente significativas entre si, pero si que lo son respecto al grupo control. Respecto al peso del intestino delgado, se observa una reducción del peso de aproximadamente la mitad del valor inicial a las 24 h de la administración de ebulina-f. A partir de ese punto, la tendencia es a recuperar los valores del grupo control. En cuanto a las longitudes del intestino delgado, no existen diferencias significativas entre los distintos resultados, si bien, la tendencia es a observar un ligero acortamiento del tejido. Por su parte, en el intestino grueso, no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto del peso y de la longitud del tejido a lo largo del estudio.

4.3. INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN IP DE DOSIS SUBLETALES DE EBULINA-F EN LA ABSORCIÓN ORAL DE VITAMINA C

4.3.1. Puesta a punto y validación de la metodología analítica (HPLC)

En la presente memoria, se ha validado para la determinación de vitamina C en plasma, un método de HPLC puesto a punto e implantado previamente por nuestro equipo de investigación (Herrero, 2013) según la metodología propuesta por Sánchez-Mata y colaboradores (2000). Los principales parámetros del método de referencia serían los siguientes:

- Fase estacionaria: Phenomenex Luna C-18 (150,0 x 4,6 mm) equipado con un guardacolumna Phenomenex C18 (4,0 mm × 3.0 mm).
- Temperatura de análisis: 40 °C
- Fase móvil: H₂SO₄ 18 mM (pH 2,6)
- Flujo: 0,9 mL/min (P: 15 bar)
- Detección: 245 nm
- V de inyección: 20 µL
- Tiempo de cromatograma: 15 min

Para evaluar la capacidad de absorción de la vitamina C en las condiciones establecidas, se procedió en primer lugar a efectuar un barrido espectrofotométrico de una solución de 10 µg/mL de principio. Tras ajustar los intervalos de dicho barrido el gráfico obtenido fue el siguiente:

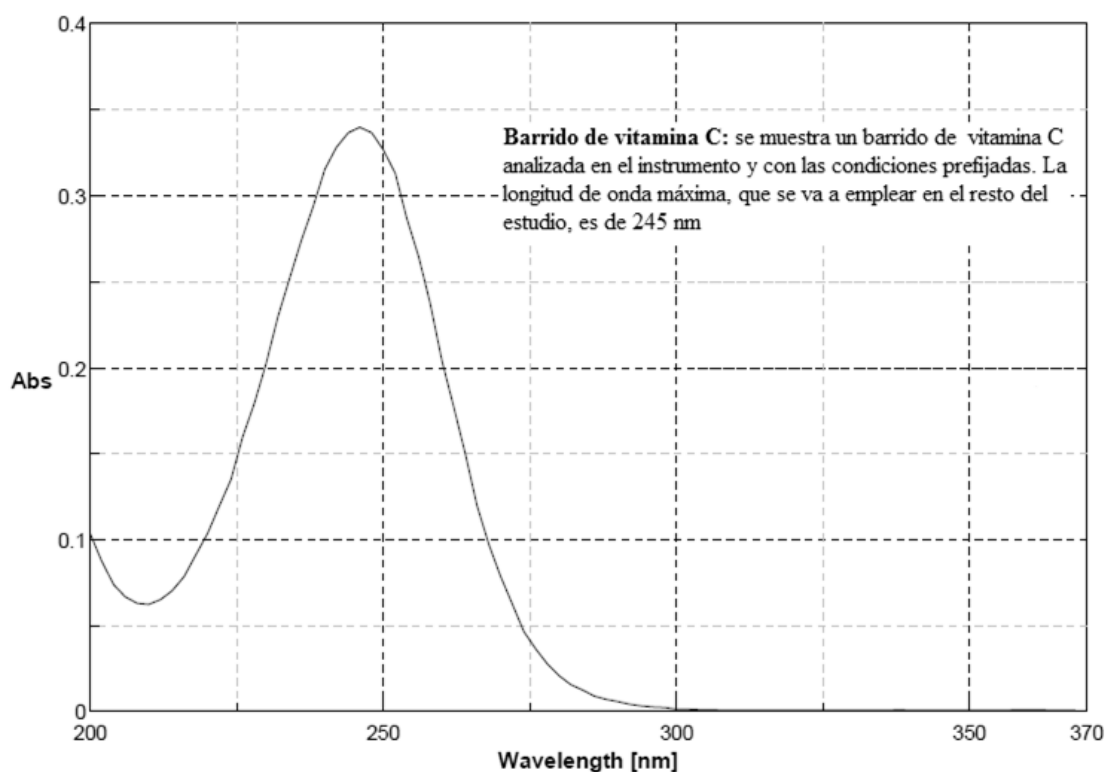


Figura R16. Barrido espectrofotométrico del patrón de vitamina C (20 $\mu\text{g/mL}$). El ácido ascórbico presenta una longitud de onda de máxima absorción a 245 nm. El ácido dehidroascórbico no absorbe a longitud de onda por encima de los 220 nm.

Por su parte, las muestras han sido elaboradas conforme al siguiente protocolo: i) en un eppendorf se añaden en primer lugar 200 μL de solución patrón de vitamina C o de plasma problema. Para la obtención del plasma una vez extraída la sangre por punción retroorbital, se centrifuga en tubos heparinizados BD Vacutainer[®] durante 10 min a 9000 r.p.m.; ii) añadir 400 μL de agua MilliQ[®] y 200 μL de DTT 10mM como reductor para asegurar que toda la vitamina C se encuentra como ácido ascórbico; agitar en vortex durante dos minutos para garantizar la mezcla de los diferentes componentes y dejar reaccionar en oscuridad durante 20 min a 4 °C; iii) añadir 200 μL de MPA 10% (4 °C) como desproteinizante y agitar en

vortex 30 segundos. La solución resultante se centrifuga durante 10 min a 9.000 r.p.m. y el sobrenadante se filtra a través de membranas de PVDF de 0,22 µm de diámetro de poro.

4.3.1.1. Resultados de la validación de la técnica analítica (HPLC)

- **Linealidad e intervalo de linealidad.**

Las concentraciones analizadas son 6, 10, 15, 30, 45 y 60 µg/mL y han sido realizadas a partir de patrones con el mismo protocolo y cantidades de reactivos con los que se preparan las muestras derivadas de las monitorizaciones de los niveles de vitamina C en plasma (Figura R17).

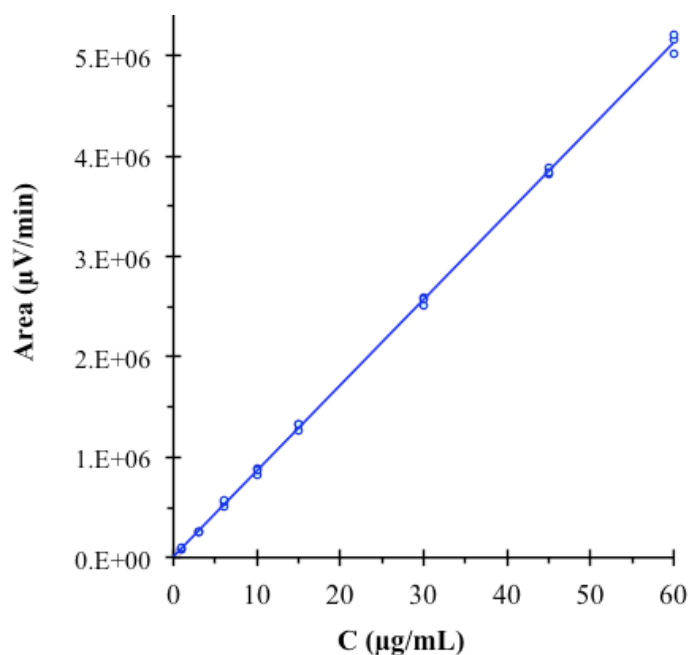


Figura R17. Recta de calibrado de Vitamina C

La ecuación general de la línea de regresión de la recta de calibrado de la validación del método es:

$$y = 85373,8922 x + 10905,9591$$

Tabla R1. Resumen de los resultados de la regresión.

Resultados de la regresión	
Ordenada en el origen	10905,9591
Desviación estandar de la ordenada en el origen	11199,2659
Coefficiente de regresión (pendiente)	85373,8922
Desviación estandar del coeficiente de regresión	389,3143
Coefficiente de correlación múltiple (r)	0,9998
Coefficiente de determinación R^2	0,9995
R^2 ajustado	0,9995
Error típico	39480,3816
Observaciones	25,0000

Tabla R2. Factores respuesta y señales de absorbancia.

C (µg/mL)	FR (Area/Concentración)	AREA (µV/min)
0	-	-
1	84265	84265
1	83513	83513
1	92858	92858
3	83680	251040
3	84291	252873
3	84731	254193
6	83982	503892
6	92012	552071
6	95828	574969
10	83032	830321
10	88693	886926
10	87453	874531
15	84924	1273858
15	88780	1331704
15	88600	1329007
30	83709	2511273
30	86543	2596294
30	85944	2578330
45	84928	3821771
45	86212	3879525
45	85366	3841478
60	83765	5025909
60	86083	5165006
60	86962	5217727

Tras calcular la desviación estándar de los factores respuesta y el factor de respuesta medio, se comprueba que el coeficiente de variación de los factores respuesta de la recta de calibrado es inferior al 5% lo que garantiza una adecuada linealidad del método:

$$CV_{factor\ respuesta} = \frac{3254,9671}{86506,4898} \times 100 = 3,7627\%$$

Por su parte, el coeficiente de variación de la pendiente inferior al 5% demuestra también la correcta linealidad del método:

$$CV_{pendiente} = \frac{389,3143}{85373,8922} \times 100 = 0,4560\%$$

El análisis del intervalo de confianza (IC) de la pendiente con un nivel de significación del 99% demuestra que existe una relación lineal entre la concentración y el área de la señal obtenida en función del tiempo:

$$IC_{pendiente} = [84280,9560 - 86466,8280]$$

El intervalo de confianza de la ordenada en el origen con un nivel de significación del 99% demuestra que el método no presenta sesgo:

$$IC_{ordenada\ en\ el\ origen} = [(-20534,14) - 42346,058]$$

- **Exactitud.**

Los valores de las muestras estudiadas para la exactitud así como sus medias, desviaciones y variación son los siguientes (Tabla R3 y Figura R18):

Tabla R3. Valores, medias, desviaciones y variación.

Cteórica ($\mu\text{g/ml}$)	Señales obtenidas			Ccalculadas			Media	σ	σ^2
	Muestra ₁	Muestra ₂	Muestra ₃	Muestra ₁	Muestra ₂	Muestra ₃			
6	535633	552071	535633	6,137	6,329	6,137	6,201	0,111	0,012
30	2578330	2596294	2562444	30,070	30,280	29,884	30,078	0,198	0,039
60	5165006	5116392	5107447	60,377	59,807	59,702	59,962	0,363	0,132

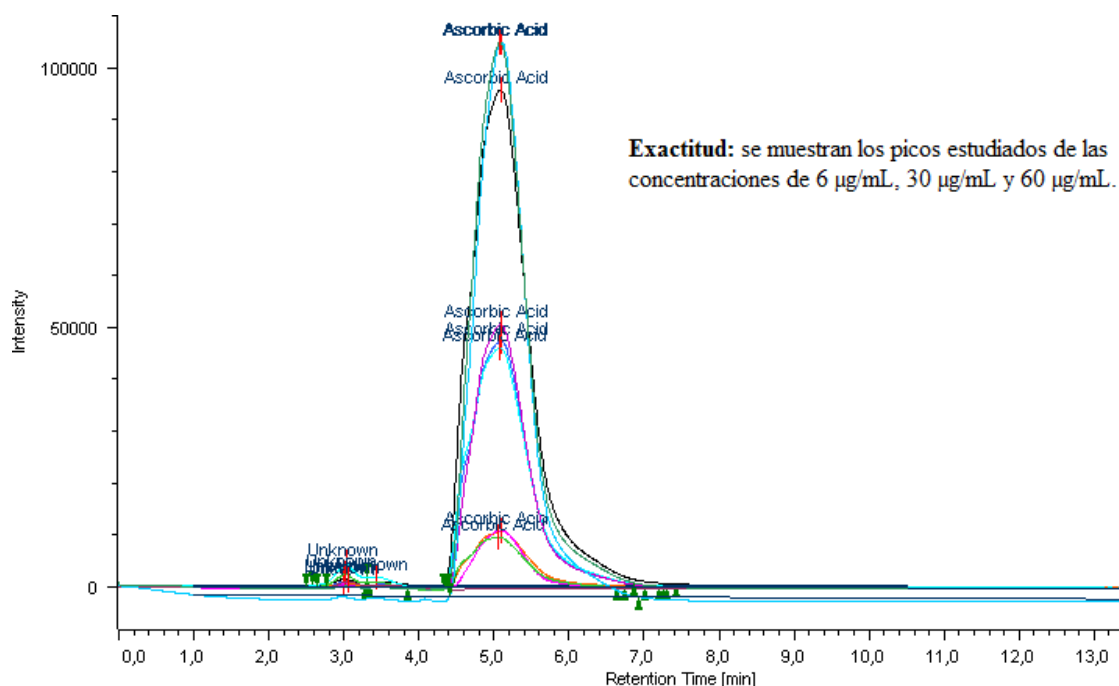


Figura R18. Superposición de los cromatogramas obtenidos a una concentración alta, media y baja (6, 30 y 60 $\mu\text{g/mL}$) empleados en el estudio de exactitud del método analítico.

Para averiguar si el factor concentración influye significativamente en los resultados, se realiza un test G de Cochran (Tabla R4):

Tabla R4. Test de Cochran.

Calculo de la G de Cochran	
S^2 máxima=	0,1317
G_{exp} =	0,7180
G_{tab} =	0,8709 (p=0,05, k=3, n=3)

La conclusión derivada de la interpretación de los datos del test G de Cochran es que el método es exacto ya que G_{exp} es menor que la G_{tab} . Por tanto el método es capaz de analizar las muestras del analito generando resultados que no se alejan de manera significativa del valor real analizado. Es decir, que se confirma que las tres varianzas son equivalentes y la concentración analizada no influye en la variabilidad del método analítico.

Para corroborar lo anterior y justificar la exactitud del método, a partir de las mismas medidas se calcula el porcentaje de recuperación y se hace un test t de Student (Tabla R5).

Tabla R5. Porcentaje de recuperación y test de Student.

Cteórica (µg/ml)	% Recuperación					
	Muestra1	Muestra2	Muestra3			
6	102,279	105,489	102,279	% recuperación medio:	101,182	%
30	100,233	100,935	99,613	Desviación estándar:	1,929	%
60	100,628	99,678	99,504	Coefficiente de variación	1,907	%
Calculo de la t de Student						
$t_{exp} = 1,8601$						
$t_{tab} = 2,3060$ ($p = 0,05$, $n = 9$, $GL = 8$)						

Con el test t de Student se confirma que el método presenta una buena exactitud para la medida del analito en las condiciones estudiadas y realizado por el mismo analista en el mismo equipo. La confirmación de la exactitud del método se obtiene porque al comparar la t_{exp} es menor que la t_{tab} se determina que la primera es menor que la segunda lo cual indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el 100% y el porcentaje de recuperación medio obtenido.

- **Precisión.**

Se determina en primer lugar el coeficiente de variación de la respuesta del método. Para ello se analizan tres réplicas y se usa un intervalo de aceptación del 95 al 115%. El CV máximo aceptable es del 3,3%. El estudio se realiza a una concentración de 30 µg/mL dando los resultados siguientes (Tabla R6 y Figura R19):

Tabla R6. Precisión. Medida de las muestras de 30 µg/mL

Señal 1	Señal 2	Señal 3	Media	σ
2480525	2481211	2511273	2491003	17558

$$CV_{respuesta} = \frac{3176,1825}{86823,2086} \times 100 = 0,7048\%$$

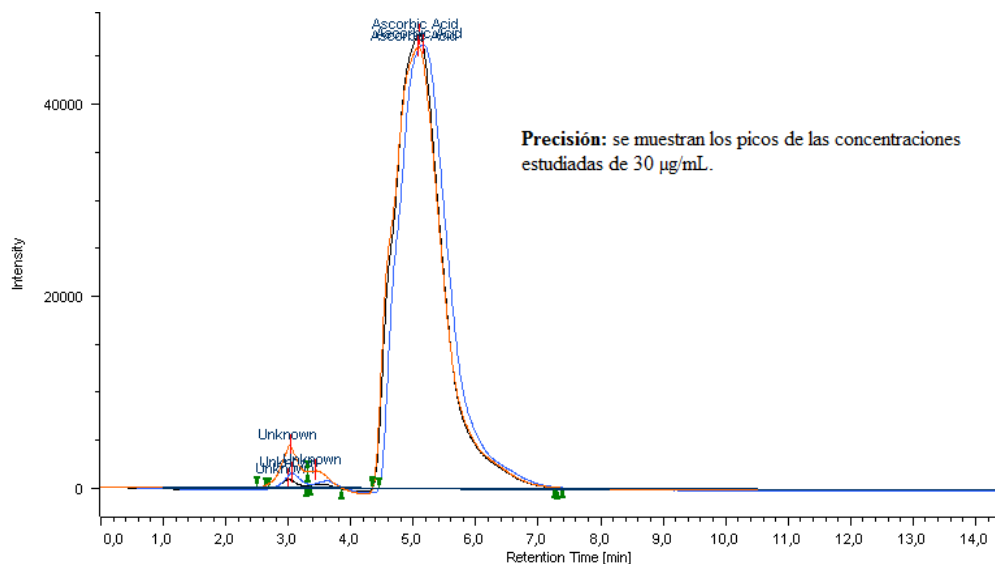


Figura R18. Superposición de los cromatogramas obtenidos a una concentración media (30 µg/mL) empleados en el estudio de exactitud del método analítico.

El método estudiado presenta un coeficiente de variación inferior al valor límite lo cual indica una adecuada precisión. Dentro de la precisión, tal y como se describió en el punto 3.2.3.2. de la presente memoria, existen otros parámetros que se describen por las ICH Q2 para la validación de un método analítico.

- Repetibilidad o repetitividad o precisión intraensayo: en este proceso de validación se han utilizado como concentraciones, para las medidas de la repetibilidad, la baja (6 µg/mL), la alta (60 µg/mL) y la media (30 µg/mL) de la recta (Tabla R7).

Tabla R7. Repetibilidad. Concentraciones baja (6 µg/mL), alta (60 µg/mL) y media (30 µg/mL) de la recta.

C (µg/ml)	Señales obtenidas						Media	σ	C.V.
	Muestra ₁	Muestra ₂	Muestra ₃	Muestra ₄	Muestra ₅	Muestra ₆			
6	537342	535633	503892	514673	503892	552071	524584	19974,6	3,81
30	2481211	2596294	2578330	2594117	2562444	2511273	2553945	47297,4	1,85
60	5107447	5025909	5165006	5116392	4941214	5217727	5095616	98991,6	1,94

Con los resultados del ensayo se confirma la buena repetibilidad del método al obtener, en todos los casos, valores de coeficiente de variación en las concentraciones estudiadas inferiores al 5%.

- Precisión intermedia: se ha probado en función del analista y en función del día.
- ✓ En función del analista: se han preparado y analizado tres concentraciones por duplicado siendo cada serie de concentraciones preparada por un investigador (Tabla R8 y Figura R19).

Tabla R8. Precisión intermedia en función del analista. Resultados obtenidos por dos investigadores diferentes.

C ($\mu\text{g/ml}$)	Analista 1		Analista 2		Media	σ	C.V. (%)
	Señal 1	Señal 2	Señal 1	Señal 2			
6	537342	535633	527415	553061	538363	10714,2	1,99
30	2481211	2480525	2528960	2532275	2505743	28756,1	1,15
60	5116392	4843691	5117595	5079119	5039199	131557	2,61

Los coeficientes de variación de las concentraciones ensayadas son inferiores al 5% en todos los casos por lo que se demuestra que el analista no influye en la precisión de los resultados obtenidos.

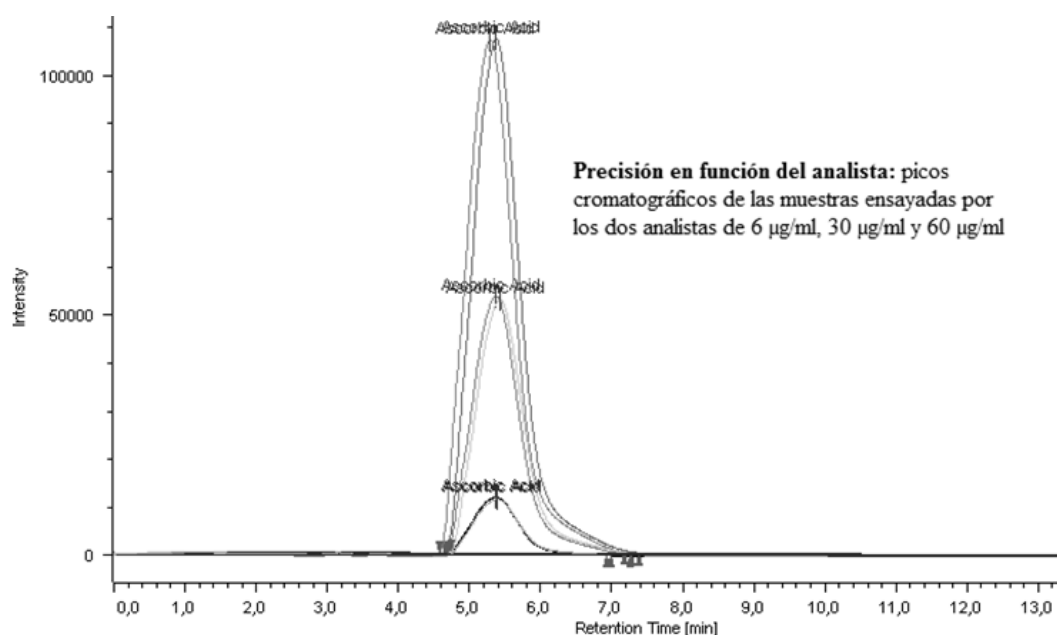


Figura R19. Precisión intermedia en función del analista. Cromatograma de la medida de las muestras de dos analistas diferentes.

- ✓ En función del día: se han preparado y analizado tres concentraciones por duplicado durante dos días consecutivos siendo preparadas el primer día por un único investigador (Tabla R9 y Figura R20).

Tabla R9. Precisión intermedia en función del día. Resultados obtenidos durante dos días consecutivos diferentes.

C (µg/ml)	Día 1		Día 2		Media	σ	C.V. (%)
	Señal 1	Señal 2	Señal 1	Señal 2			
6	503892	567377	424201	534969	507610	61350,1	12,09
30	2511273	2594117	2274629	2578330	2489587	147737	5,93
60	5025909	4941214	4840679	4217727	4756382	366998	7,72

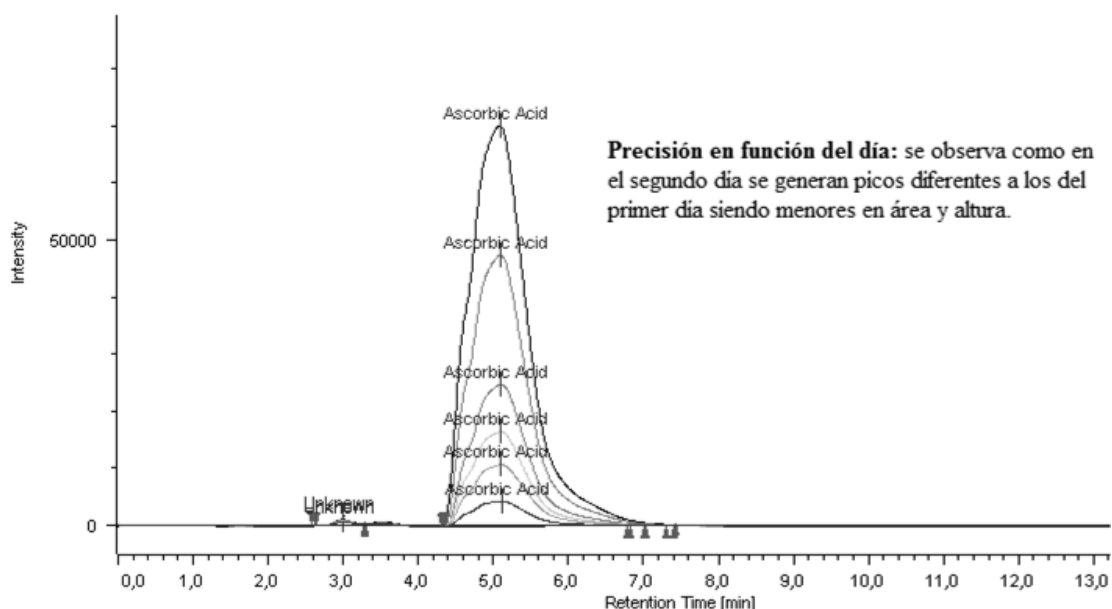


Figura R20. Precisión intermedia en función del día. Cromatograma de la medida de las muestras en dos días consecutivos.

En este ensayo se ha determinado que las muestras no se pueden analizar en días sucesivos, es decir que deben ser analizadas en el momento de la toma de muestra. Esto se debe a la inestabilidad de la vitamina C si no se mantiene en condiciones óptimas de pH, temperatura y ausencia de oxígeno. En todas las concentraciones estudiadas el valor del coeficiente de variación es superior al 5% y por tanto no es un método preciso en función del día.

- **Especificidad.**

Mediante este estudio se pretende determinar que las condiciones analíticas seleccionadas son capaces de analizar el analito sin interferencia del resto de posibles componentes presentes en la muestra. Así en primer lugar se evaluó la posible interferencia ocasionada por los reactivos empleados en la preparación de la misma, MPA y DTT (Figuras R21-R23). A la vista de los cromatogramas obtenidos, se puede afirmar que los reactivos empleados en la elaboración de la muestra no interfieren en el análisis de la vitamina C, al presentar un tiempo de retención inferior a la vitamina.

En un segundo estudio de especificidad, se evaluó si los diferentes componentes presentes en el plasma de ratón, podrían interferir en la lectura. Lo primero que se realizó fue una comparación entre plasma blanco y una muestra de plasma contaminada con vitamina C (Figura R24). En base a los cromatogramas obtenidos se consideró válido la metodología propuesta a expensas de conocer el porcentaje de recuperación de vitamina C en muestras de plasma contaminadas, ya que en el plasma sin contaminar

se da una ligera lectura derivada de la concentración plasmática basal de vitamina C de los roedores.

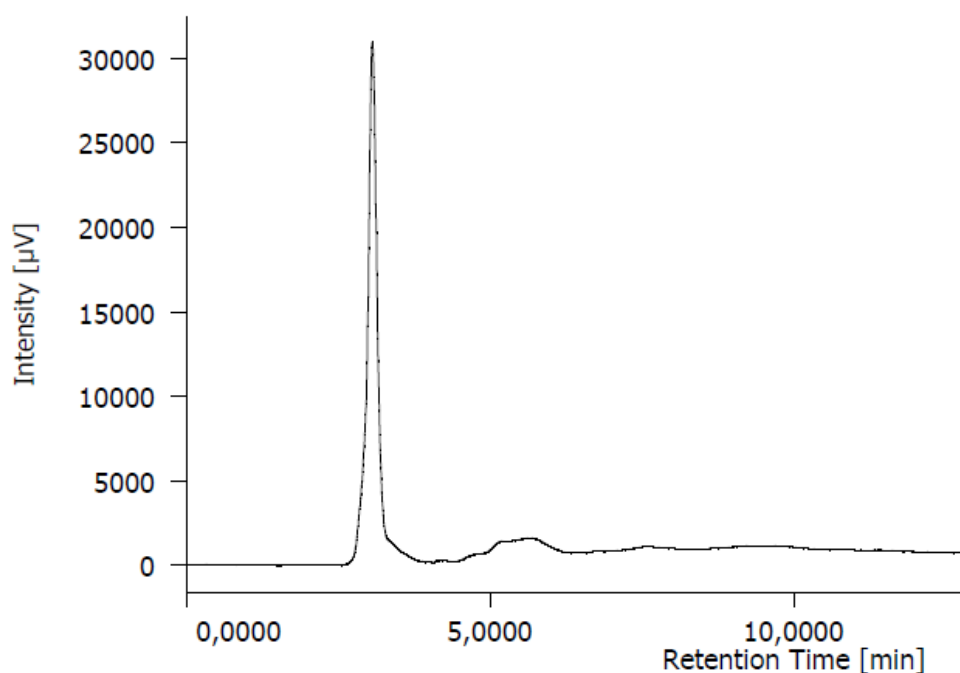


Figura R21. Cromatograma de DTT en las condiciones propuestas.

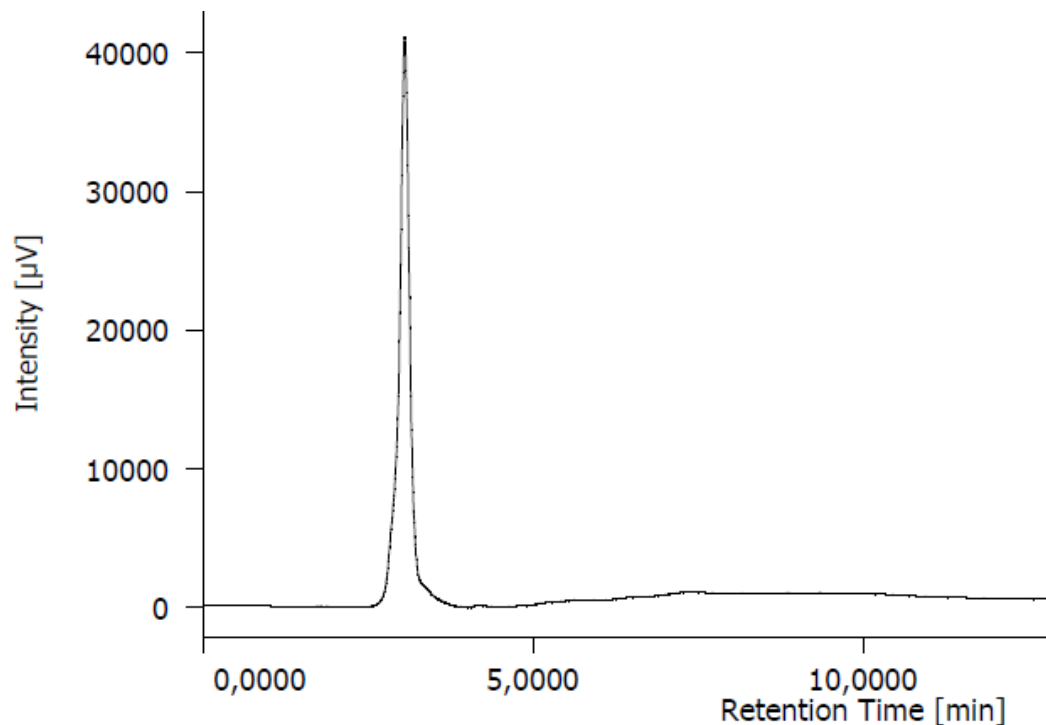


Figura R22. Cromatograma de MPA en las condiciones propuestas.

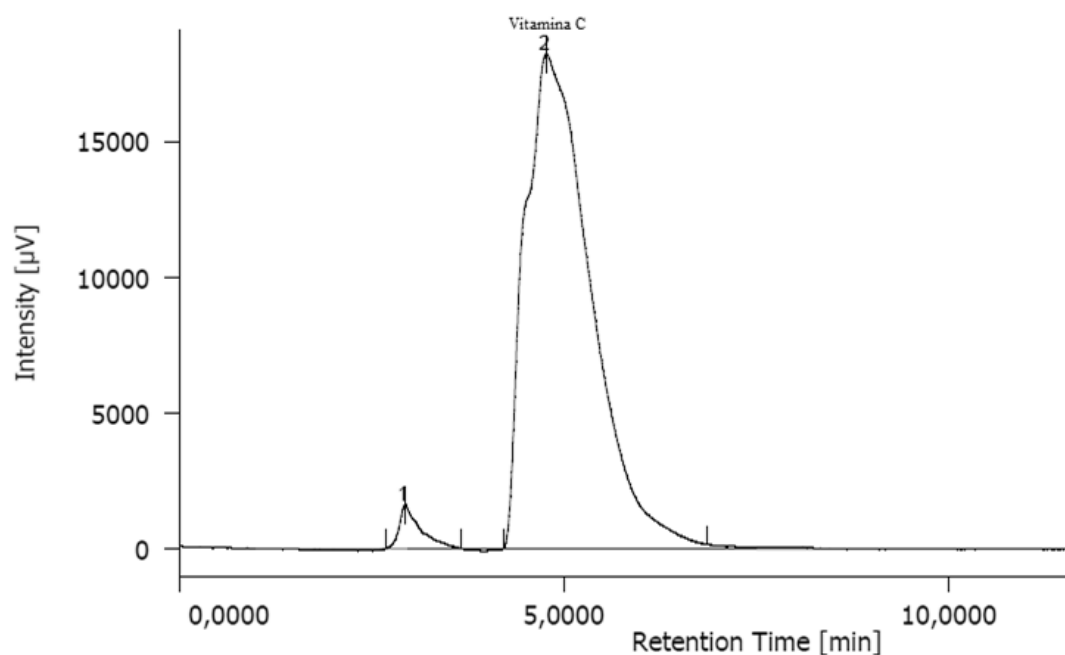


Figura R23. Cromatograma de vitamina C en ausencia de MPA y DTT. El pico de ácido ascórbico aparece desdoblado por el equilibrio REDOX con el ácido dehidroascórbico.

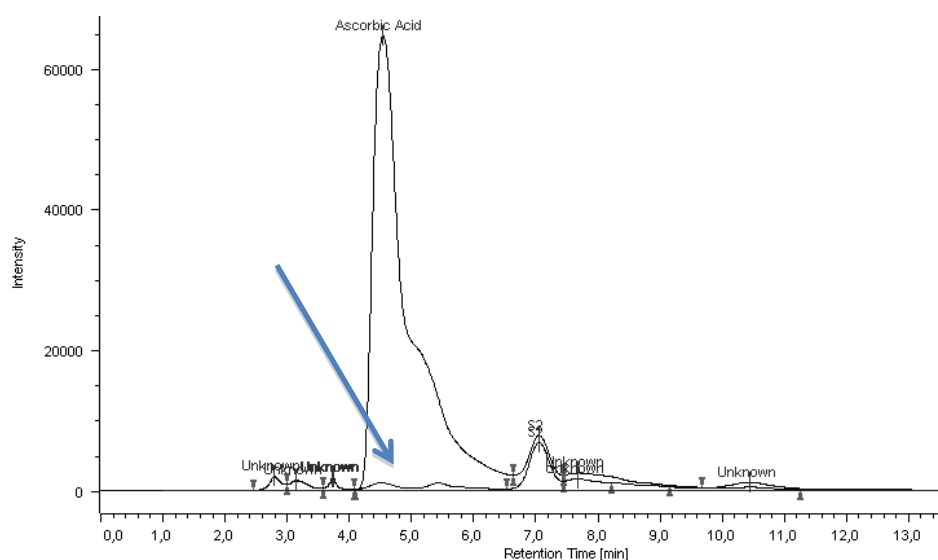


Figura R24. Cromatogramas de plasma blanco y plasma contaminado con vitamina C (30 μg/mL). El plasma blanco presenta una pico de vitamina C correspondiente con el valor basal del animal.

Por último, se evaluó el plasma contaminado con una solución patrón de vitamina C a la misma concentración para determinar los porcentajes de recuperación (Tabla R10 y Figura R25).

Tabla R10. Porcentaje de recuperación de una muestra de plasma contaminada con 30 µg/mL de vitamina C.

Solución	Señal	C (µg/ml)	Recuperación (%)
Patrón sin plasma	30 µg/ml	2578330	30,070
Patrón con plasma	30 µg/ml	2658032	31,004

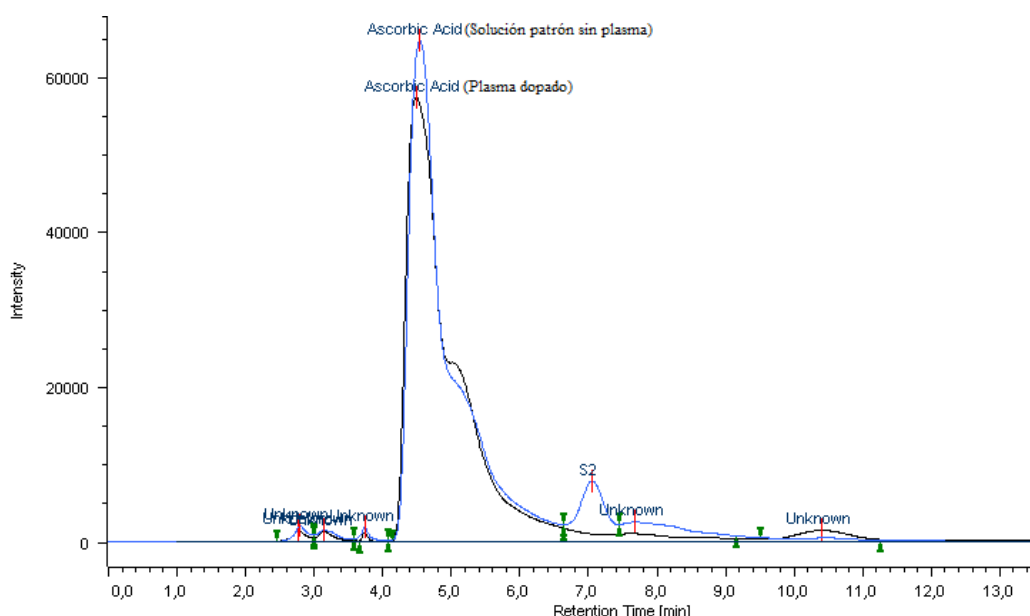


Figura R25. Cromatogramas de una solución patrón de vitamina C (30 µg/mL) y plasma contaminada con vitamina C (30 µg/mL).

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que no hay interferencias apreciables entre los análisis de plasma contaminado o de muestra patrón pura. Con ello se confirma que no van a afectarse los valores de las medidas de las muestras obtenidas directamente de los animales tratados con vitamina C, obteniendo valores reales de concentración plasmática sanguínea del marcador.

- **Límites de detección y de cuantificación.**

Los límites de detección y cuantificación para el análisis de la vitamina C en plasma se calculan conforme a la metodología propuesta por la ICH a partir de los datos de la recta de regresión y de las lecturas de un número establecido de blancos. El límite de detección del método es 15,0 ng/mL y el de cuantificación 45,6 ng/mL.

- **Robustez.**

La robustez se ha determinado mediante un cambio de la fase móvil; en concreto se ha cambiado el agua acidulada (ácido sulfúrico a pH 2.6) por agua Milli Q[®] (Figura R26-R27) y se han evaluado los cromatogramas obtenidos a una concentración alta, media y baja dentro del intervalo de concentraciones en las que se ha demostrado linealidad.

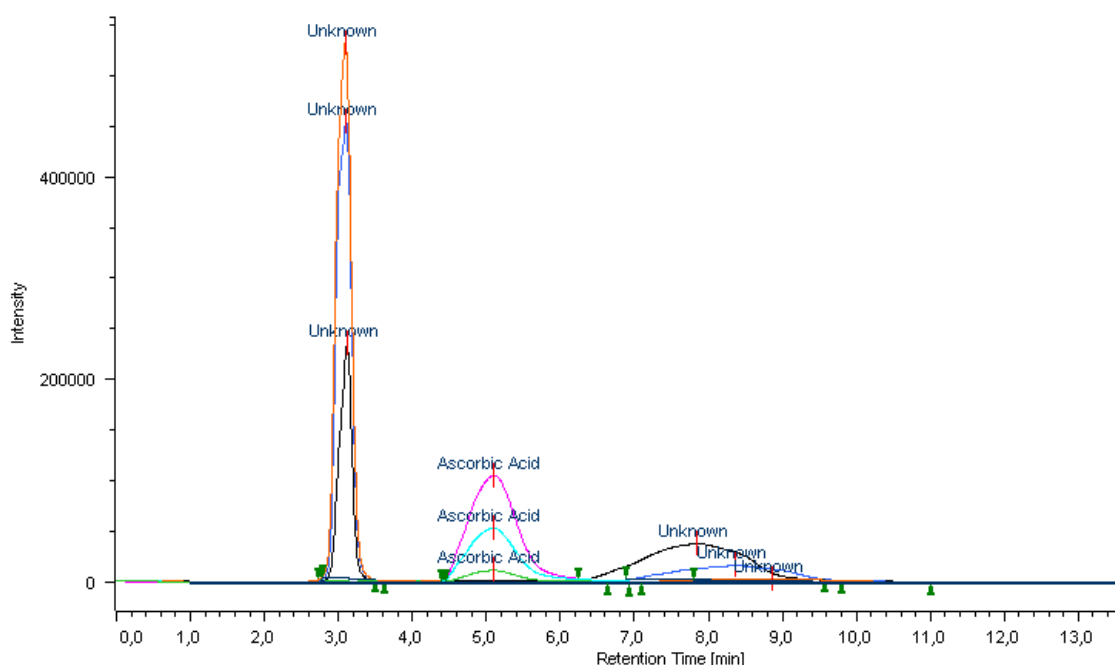


Figura R27. Patrones de 6, 30 y 60 µg/mL de vitamina C analizados en las condiciones propuestas

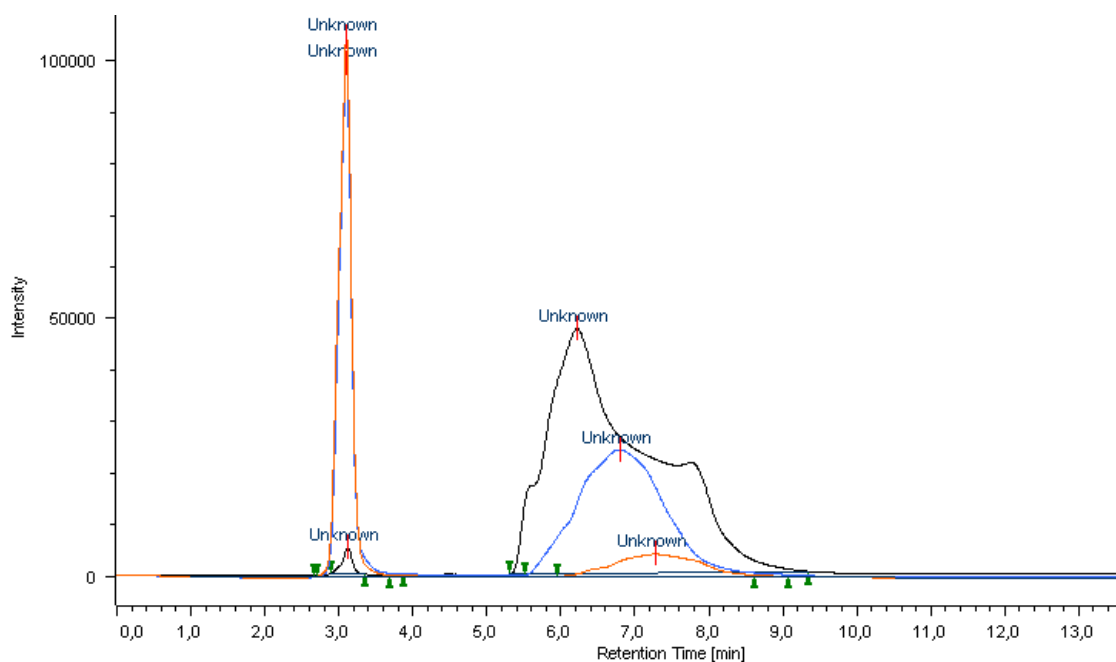


Figura R28. Patrones de 6, 30 y 60 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina C analizados en las condiciones alternativas (FM: agua Milli-Q[®])

Los análisis con los cambios de las fases móviles dan valores totalmente diferentes ya que en el agua se genera una lectura con perfiles desplazados, asimétricos y no reproducibles. No se observa con el agua una correlación lineal de los puntos determinados. Es decir, la señal obtenida a partir de la muestra de concentración de analito 30 $\mu\text{g/mL}$ no es la mitad de la obtenida de la muestra de 60 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2. Determinación de los parámetros farmacocinéticos de absorción de vitamina C tras su administración oral en ratones.

Para establecer si el método de cuantificación de vitamina C por HPLC validado es adecuado para el estudio propuesto, es necesario determinar en primer lugar la relación entre la dosis de vitamina C administrada y la concentración plasmática obtenida. La vitamina C es un compuesto necesario para la vida por lo que siempre encontraremos una cierta cantidad de vitamina en los análisis que efectuemos, incluso en animales a los que no se les haya administrado. Por otra parte, tras su administración oral, la vitamina C no se absorbe en su totalidad, estando condicionada su biodisponibilidad por degradaciones en el intestino, pérdidas por heces o la variabilidad entre las concentraciones interindividuales. Por todo ello se han ensayado dosis de vitamina C lo más elevadas posible pero que no produzcan efectos adversos a los animales ensayados. El protocolo para llevar a cabo este estudio ha consistido en primer lugar en determinar el peso de cada ratón para ajustar la dosis y marcar convenientemente cada animal; dos horas antes de la administración del bolo oral de vitamina, se ha retirado el alimento sólido (permitiendo el acceso ilimitado a agua), para tratar de reducir en la medida de lo posible regurgitaciones de la dosis administrada; por último, tras la administración vía oral de un bolo único de 0,1 mL de vitamina C en agua a concentraciones de 100 y 500 mg/kg de peso se ha procedido a la extracción de sangre por punción retroorbital a tiempos prefijados y a su análisis inmediato conforme a la metodología propuesta.

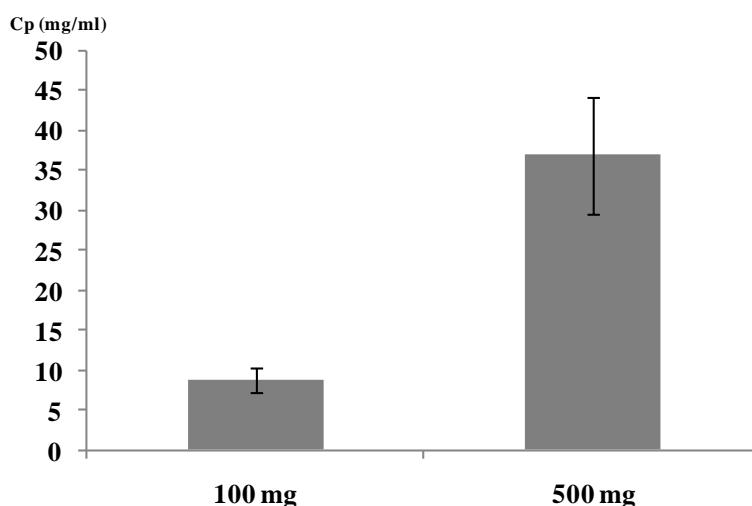


Figura R29. $C_{\text{máx}}$ de vitamina C obtenidas a las dosis ensayadas

Se determinó, en base a los ensayos realizados, que la dosis que debería emplear es la de 100 mg/kg, ya que las concentraciones en plasma obtenidas están situadas en la parte central de la recta de calibrado que se ha utilizado en la validación del método analítico de HPLC. La dosis de 500 mg/kg se ha descartado por dar concentraciones elevadas por encima de los valores medios de la recta de validación e incluso se planteó la posibilidad de que se diesen señales tan elevadas que pudieran incluso colapsar el detector. Por su parte el tiempo máximo de absorción ($t_{\text{máx}}$), o tiempo al que tras su administración, la concentración del analito en sangre es máxima, es de 80 minutos.

No se han descrito fenómenos de toxicidad a la hora de administrar dosis que superen en gran medida la cantidad diaria recomendada de vitamina C en animales o en humanos. La vitamina C por pertenecer al grupo de las vitaminas hidrosolubles se elimina muy fácilmente por orina. Por ello, aunque se administren dosis elevadas de este micronutriente el organismo es capaz de eliminarlo de forma rápida manteniendo concentraciones plasmáticas adecuadas.

4.3.3. Evolución de los parámetros farmacocinéticos de absorción de vitamina C tras su administración oral en ratones tratados previamente con dosis subletales de ebulina-f.

En este estudio se realizaron perfiles de niveles plasmáticos de vitamina C en sangre a ratones tratados y no tratados con ebulina-f intraperitoneal a dosis única de 2,5 mg/kg conforme al protocolo descrito en el punto 3.2.3.1. del apartado de “Materiales y métodos” de la presente memoria. Los grupos ensayados son control, 1 día tras el tratamiento (24 h), 3 días tras el tratamiento (72 h) y 22 días tras el tratamiento (Figura R30). El planteamiento experimental se fundamenta en poder controlar los daños causados durante los días de máxima actividad de la proteína (días 1 y 3) comparándolo con el grupo control, y además, poder observar con un periodo de tiempo prudencial, la recuperación del perfil de concentraciones plasmáticas del grupo control.

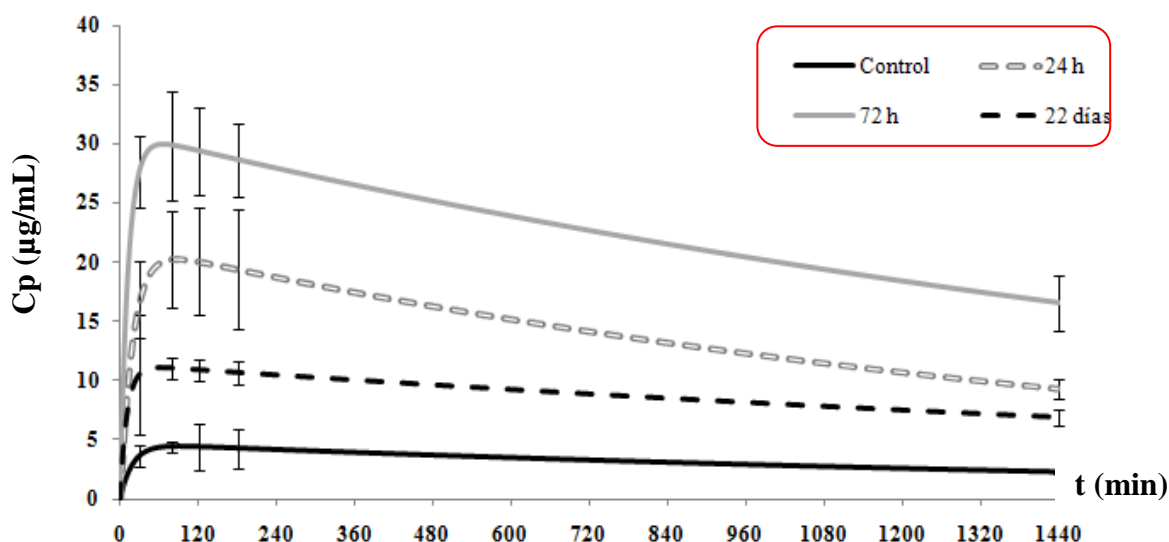


Figura R30. Perfiles de concentración plasmática de vitamina C durante 24h, tras la administración de un bolo oral de 100 mg/kg, en animales previamente tratados con dosis IP subletales de ebulina-f.

Los perfiles obtenidos muestran como se incrementa la absorción de vitamina C de manera significativa en el grupo 24 horas respecto a grupo control y en el de 72 horas respecto al grupo 24 horas. Tras mantener los animales 22 días, se observa un retorno a los niveles de absorción que presenta el grupo control, con una disminución significativa de la absorción de vitamina C respecto al grupo de 72 horas. En los animales que han sufrido la administración de ebulina-f, a dosis de 2,5 mg/kg, se observan los siguientes cambios en los parámetros biofarmacéuticos de vitamina C:

- Tiempo máximo de absorción ($t_{\text{máx}}$): aunque se traten los animales con ebulina-f, no se produce variación significativa del tiempo máximo de absorción. Por tanto se deduce que no hay cambios significativos en el aspecto de los perfiles plasmáticos animales control o animales tratados.
- Concentración máxima de absorción ($C_{\text{máx}}$): al comparar las concentraciones que presenta la $C_{\text{máx}}$ como en el resto de concentraciones estudiadas, se deduce que hay un incremento significativo de los valores que alcanzan en los grupos de 24 horas, 72 horas y 22 días respecto a control. Debiendo de indicar que se genera un incremento de las concentraciones hasta las 72 horas de estudio tras las que se produce un decrecimiento de las concentraciones en el grupo de 22 días.
- Área bajo la curva (AUC): el AUC calculado desde el inicio del ensayo hasta el final del mismo del grupo 24 horas es aproximadamente cinco veces superior al del grupo control. Por su parte, el AUC del grupo 72 horas presenta un incremento significativo respecto a 24 horas y es aproximadamente nueve veces superior al del grupo control. Por último, el grupo 22 días presenta una disminución del valor de AUC significativo respecto al grupo 72

horas, no observándose diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo 24 horas. Destacar que tras 22 días tras la administración IP de dosis subletales de ebulina-f, los valores de absorción de vitamina C son todavía muy superiores a los obtenidos en el grupo control (Figura R31).

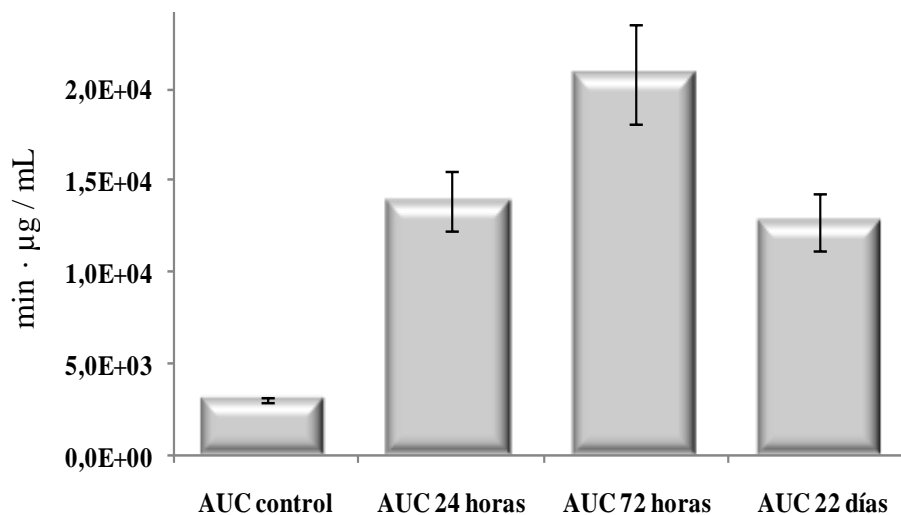


Figura R31. AUC de los perfiles de concentración plasmática de vitamina C durante 24h, tras la administración de un bolo oral de 100 mg/kg, en animales previamente tratados con dosis IP subletales de ebulina-f.

- Constante de absorción (K2), constante de eliminación (K1) y punto de intersección en el eje “y” (A) (Figura R32). No se observan variaciones significativas en la constante de absorción de la vitamina C como consecuencia de la administración IP de dosis subletales de ebulina-f. Por tanto no se generan modificaciones cualitativas del mecanismo intestinal de absorción pero si cuantitativas. En este sentido, se podría afirmar que la ebulina-f facilita la absorción intestinal de vitamina C.

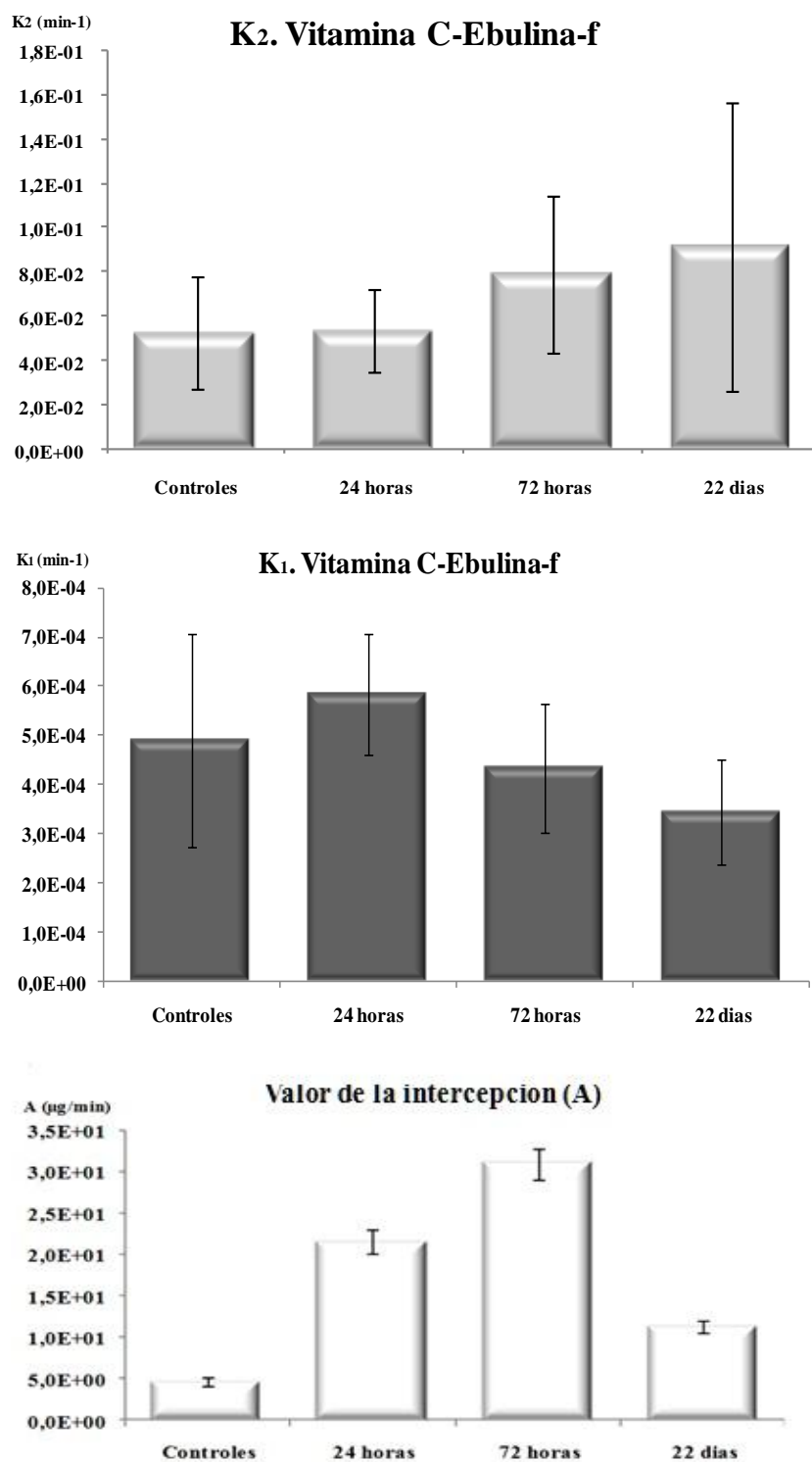


Figura R32. Constante de absorción (K2), de eliminación (K1) y punto de intersección en el eje “y” (A) derivados de los perfiles de Cp de vitamina C durante 24h, en animales previamente tratados con dosis IP subletales de ebulina-f.

No se observan diferencias significativas en las constantes de eliminación de los grupos ensayados. Este hecho junto con la evaluación de los perfiles de Cp-t, que tienden a converger a un punto basal pero que no alcanzan, indican la saturación del mecanismo de eliminación. Así, a partir de una concentración plasmática, la eliminación del organismo es constante debido a que los mecanismos de eliminación de las moléculas se saturan y no pueden aumentar su velocidad de trabajo. Por tanto, la dosis oral administrada sobresatura la eliminación hepato-renal pero no la absorción a nivel intestinal.

La comparativa de los valores de A entre el grupo de los animales no tratados respecto al grupo de 24 horas demuestra un incremento de éste de manera significativa. La comparativa entre el grupo de 72 horas respecto del grupo de 24 horas también denota un incremento significativo del valor A. Por último en el grupo de 22 días se observa un decrecimiento del valor de manera significativa respecto del grupo de 72 horas, pero no se asemeja de manera significativa al valor obtenido por el grupo control.

Un análisis global de todos los datos obtenidos demuestra que se generan procesos de modificación y transformación del sistema de absorción de manera cuantitativa. Los daños aumentan cuanto más tiempo transcurre desde la administración de la dosis de ebulina-f hasta las 72 horas tras la inoculación. Cuando transcurren 22 días tras la administración, se tiende a retomar los valores inicialmente obtenidos por el grupo control. Por otra parte no se observan cambios a nivel de la eliminación del xenobiótico por el colapso desde el inicio del estudio de los sistemas de eliminación derivado de la administración de dosis anormalmente elevadas.

4.4. INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN IP DE DOSIS SUBLETALES DE EBULINA-F EN LA ABSORCIÓN ORAL DE GLUCOSA

4.4.1. Determinación de los parámetros farmacocinéticos de absorción de glucosa tras su administración oral en ratones.

Para determinar correctamente los parámetros farmacocinéticos de absorción de glucosa tras su administración oral en ratones, es necesario previamente establecer con un grupo reducido de animales, la relación entre los perfiles plasmáticos y la dosis administrada. Los resultados de este estudio previo aporta las siguientes conclusiones:

- La dosis oral a administrar en un bolo único más indicada es 2 g/kg. Esta dosis ha sido empleada por otros autores previamente en diversos estudios en ratones, no produce ningún tipo de efecto secundario en el animal a corto, medio o largo plazo, genera perfil plasmático fácilmente cuantificable durante todo el tiempo del ensayo (Figura R33) y es sencillo de administrar a los animales, ya que puede prepararse en una disolución de glucosa al 60% (p/v)
- El tiempo de ayuno previo establecido es de 4 h ya que con este tiempo se consigue un nivel basal de glucemia que permite la realización de los perfiles farmacocinéticos. No se han observado diferencias significativas entre los niveles plasmáticos que se logran tras 4 horas de ayuno respecto a los que se obtienen a las 16 horas de ayuno, y con un tiempo más corto, se reduce el nivel de estrés del animal y se facilita notablemente el diseño de los estudios.
- Los tiempos de muestreo más adecuados tras la administración de la dosis oral para trazar adecuadamente los perfiles de glucosa serían 5, 10, 20, 30, 60 y 90 minutos.

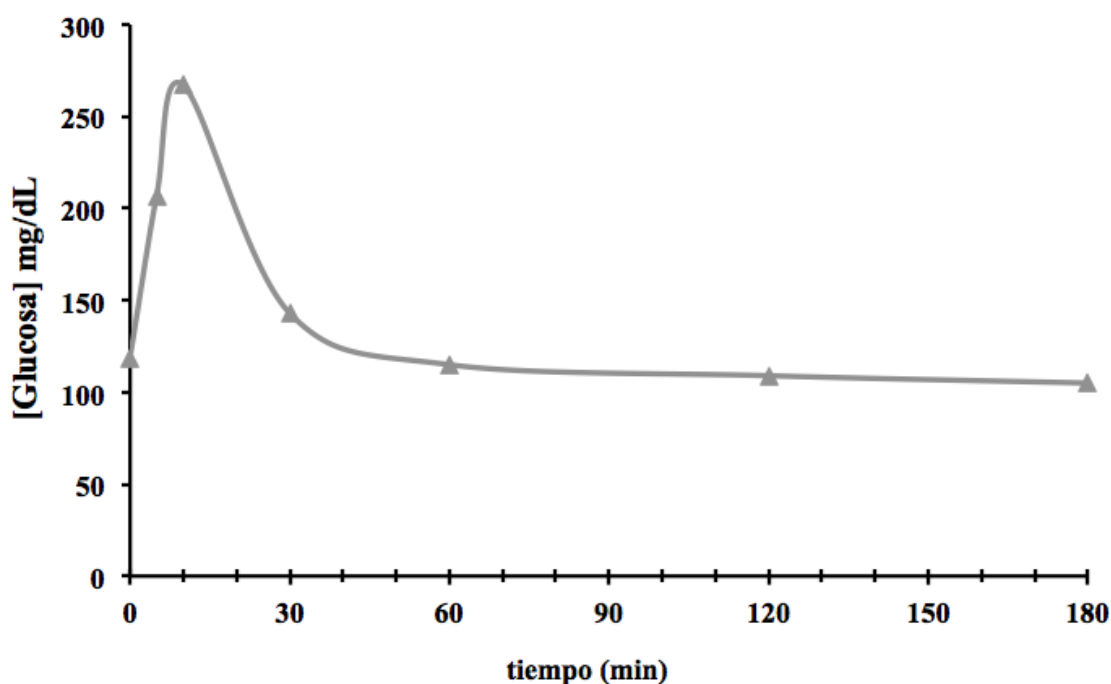


Figura R33. Ejemplo de perfil de concentración plasmática en función del tiempo tras la administración de un bolo oral de 2 g/kg de glucosa.

En base a las premisas obtenidas en este estudio previo, se determinaron los parámetros farmacocinéticos de absorción de glucosa tras su administración oral en ratones (Figura R34). Los principales resultados obtenidos tras la evolución de los correspondientes perfiles han sido los siguientes:

- El tiempo máximo de absorción ($t_{\text{máx}}$): se sitúa a los 10 minutos tras la administración de glucosa oral en forma de bolo.
- La concentración máxima de absorción ($C_{\text{máx}}$): el valor que se obtuvo de los análisis es de 322,96 (\pm 37,57) mg/dL. Este valor ha sido determinado con un nivel de significación del 95% ($\alpha = 0,05$).

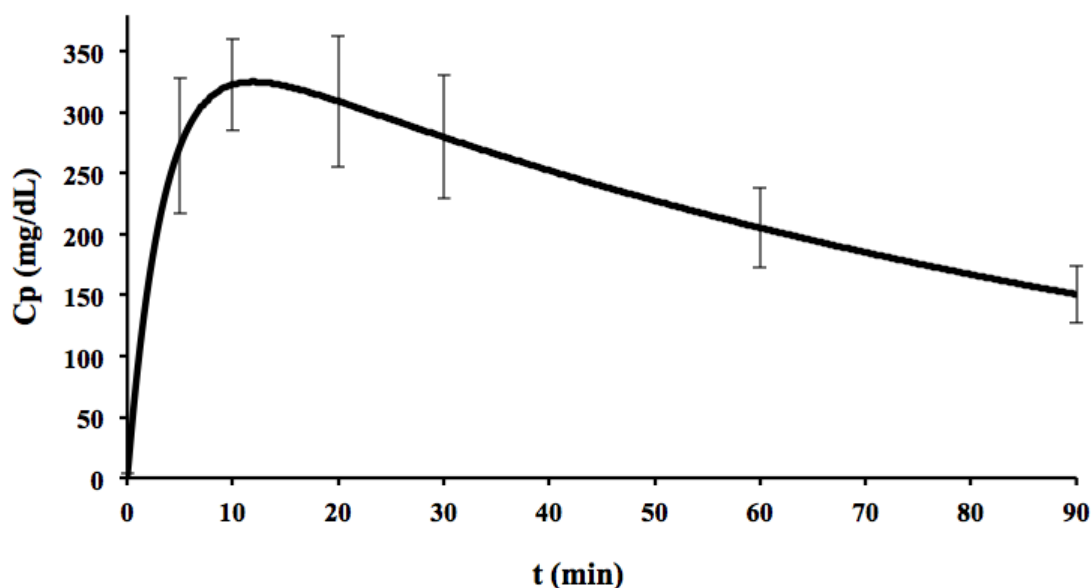


Figura R34. Perfil de concentración plasmática en función del tiempo tras la administración de un bolo oral de 2 g/kg de glucosa.

Respecto a la posible toxicidad de la glucosa se ha de considerar que es ínfima si se administra de manera puntual incluso en grandes cantidades. Esta inocuidad deriva de ser una biomolécula muy extendida por todos los seres vivos. En los organismos más desarrollados, como es el caso de los mamíferos (ratones), en caso de tener un consumo, voluntario o forzoso, elevado de glucosa existen mecanismos de control de la glucemia sanguínea. El control deriva de la regulación hormonal mediada por la insulina y por el glucagón. La única toxicidad que podría desarrollarse en caso de mantener concentraciones plasmáticas continuamente elevadas, siendo esto la enfermedad de diabetes mellitus. La diabetes tiene múltiples causas siendo al final una desregulación de los niveles de insulina la causante final de los niveles elevados de glucosa en plasma.

4.4.2. Evolución de los parámetros farmacocinéticos de absorción de glucosa tras su administración oral en ratones tratados previamente con dosis subletales de ebulina-f.

En este estudio se realizaron perfiles de niveles plasmáticos de glucosa en sangre a ratones tratados y no tratados con 2,2 mg/kg de ebulina-f IP. Los grupos ensayados han sido, control y 1, 3 y 9 días tras el tratamiento (Figura R35). El planteamiento experimental se fundamenta en poder controlar los daños causados durante los días de máxima actividad de la proteína (días 1 y 3) comparándolo con el grupo control, y además, poder observar con un periodo de tiempo prudencial, la recuperación del perfil de concentraciones plasmáticas del grupo control.

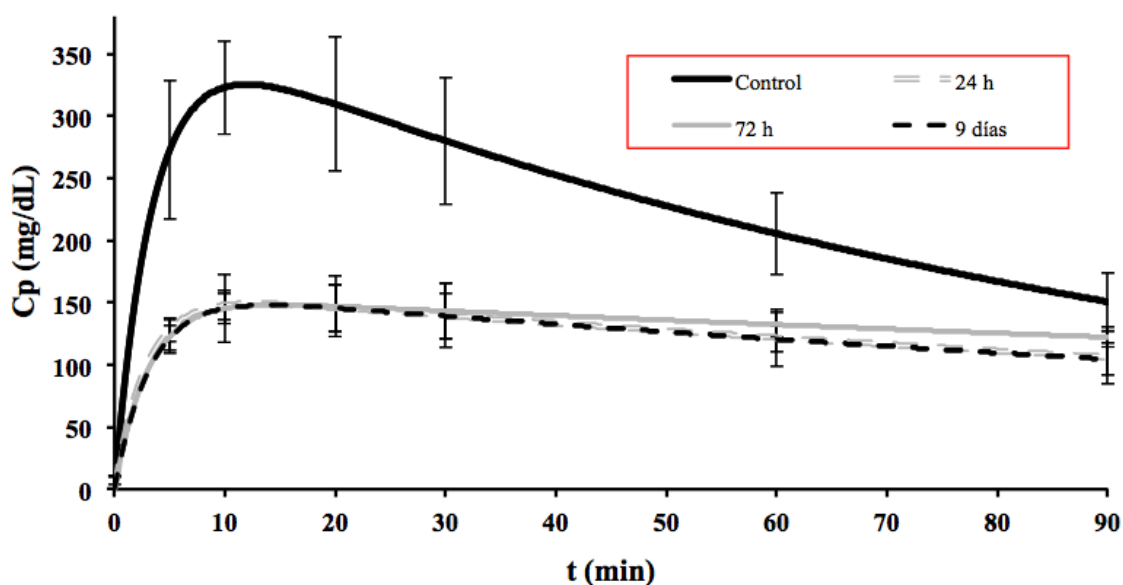


Figura R35. Perfiles de concentración plasmática de glucosa tras la administración de un bolo oral de 2 g/kg, en animales previamente tratados con dosis IP subletales de ebulina-f.

Los perfiles de glucemia obtenidos indican que los animales tras el tratamiento con ebulina-f (2,2 mg/kg), desde las primeras 24 horas tras el tratamiento, presentan niveles de glucemia orgánicos máximos de valor

significativamente inferior a los valores alcanzados por el grupo control. Por otra parte, al comparar las concentraciones plasmáticas obtenidas por los grupos de 24 horas, 72 horas y 9 días tras el tratamiento no son diferentes de manera significativa. Siendo todas significativamente inferiores a las del grupo control. Respecto a los parámetros biofarmacéuticos evaluados indicar:

- Tiempo máximo de absorción ($t_{m\acute{a}x}$): no se producen modificaciones significativas en el tiempo máximo de absorción y por tanto tampoco en el aspecto de los perfiles plasmáticos obtenidos.
- Concentración máxima de absorción ($C_{m\acute{a}x}$): los niveles alcanzados tanto en la $C_{m\acute{a}x}$ como en el resto de puntos del perfil son significativamente inferiores a los del grupo control. Derivado todo ello del daño generado a nivel de las criptas que no permite la normal absorción de glucosa.
- Constante de absorción (K_2), constante de eliminación (K_1) y punto de intersección en el eje “y” (A): al realizar la comparación de las constantes de absorción no se observa ninguna variación significativa entre los grupos estudiados. Con ello se confirma que la ebulina-f reduce la cantidad de proteínas transportadoras de glucosa presentes en la luz intestinal (Figura R35). Al evaluar las constantes de eliminación, se observa como en los grupos de los animales tratados hay una disminución significativa respecto a los animales del grupo control. Esta disminución de la constante de la eliminación está en consonancia con los perfiles obtenidos, ya que los controles como absorben más glucosa, la eliminan con mayor rapidez respecto al resto de los grupos. Por lo indicado además se confirma que no se producen modificaciones en el proceso de eliminación de la glucosa.

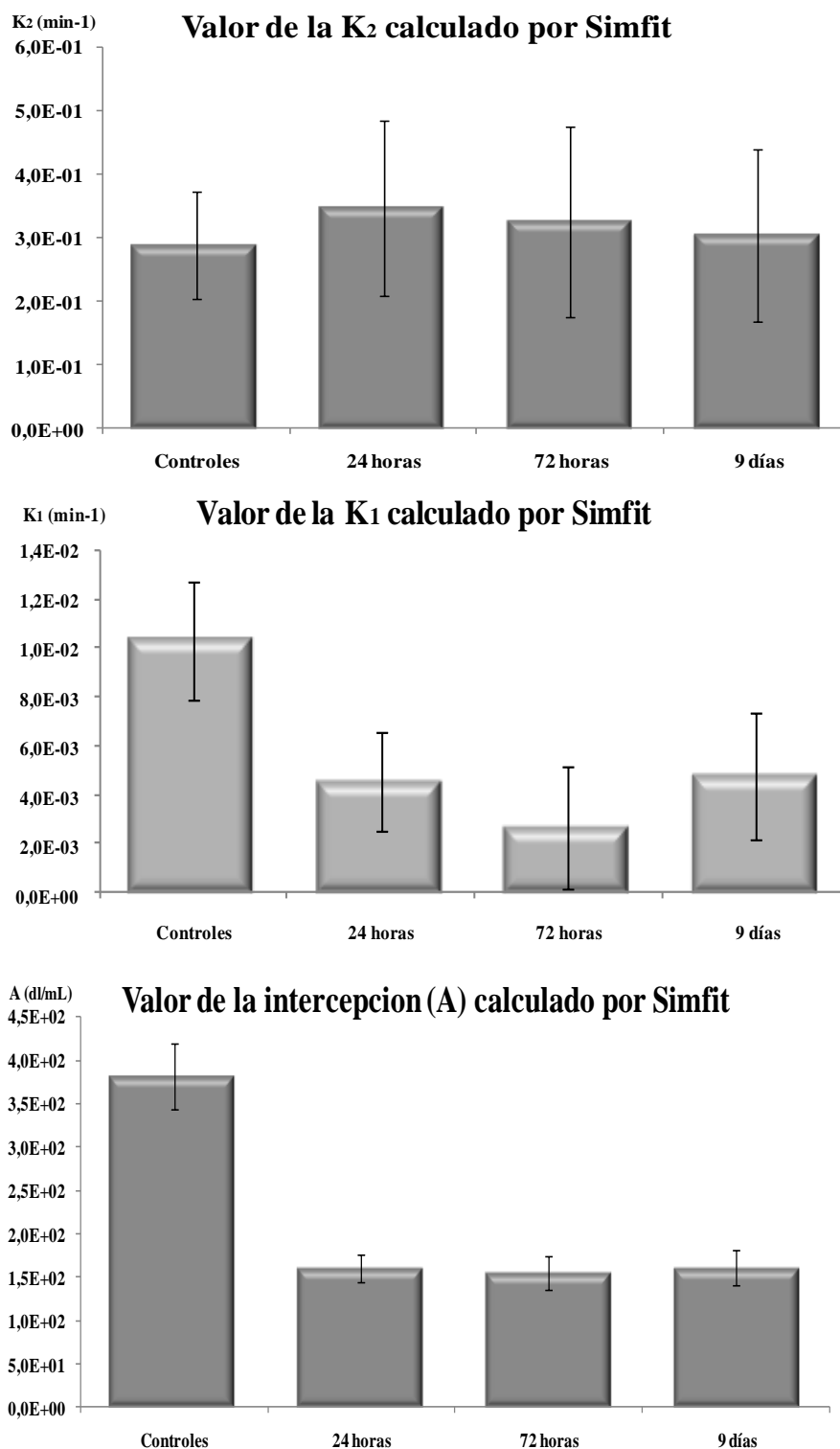


Figura R35. Constante de absorción (K₂), de eliminación (K₁) y punto de intersección en el eje “y” (A) derivados de los perfiles de C_p de glucosa, en animales previamente tratados con dosis IP subletales de ebulina-f.

Al comparar los valores de A se observa que se genera una disminución del valor de los grupos inoculados con proteína respecto del control de manera significativa. Por otra parte, no se observan diferencias significativas de los grupos inoculados entre sí.

- Área bajo la curva (AUC): el AUC en el grupo control es muy superior respecto al resto de los grupos, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas con el grupo de 3 días. Por otra parte los grupos tratados previamente con ebulina f (1, 3 y 9 días) no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí siendo por tanto grupos con perfiles plasmáticos equivalentes (Figura R36).

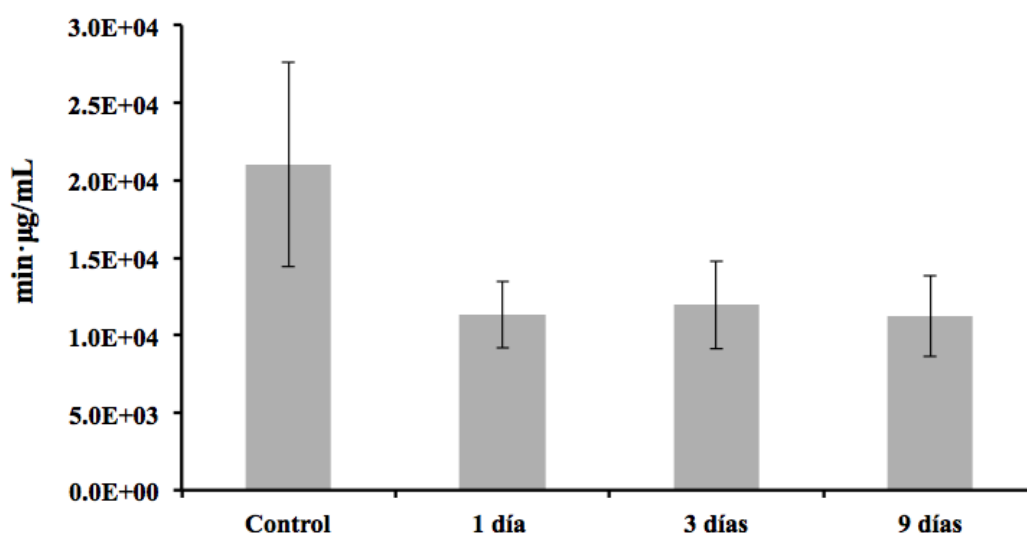


Figura R36. AUC de los perfiles de concentración plasmática de glucosa, tras la administración de un bolo oral de 2g/kg, en animales previamente tratados con dosis IP subletales de ebulina-f.

5. DISCUSIÓN.



El proceso de obtención y caracterización de ebulina-f de alta pureza que se ha empleado en la realización de esta tesis ha sido previamente descrito por Citores y cols., 1998 y Jiménez y cols., 2013. Brevemente, tras la obtención del extracto crudo y su posterior clarificación, el sobrenadante es sometido a una cromatografía de afinidad para obtener los componentes con afinidad por D-galactosa. Las principales proteínas aisladas en esta fase son la SEA, la SELfd, una lectina-D-galactosa homodimérica y la ebulina-f, una isoforma de la ebulina-L. A continuación se lleva a cabo una cromatografía de exclusión molecular a través de una columna Superdex 75 HiLoad y la solución resultante es dializada frente a agua desionizada y concentrada hasta alcanzar concentraciones de ebulina-f en el intervalo 2,5-4,0 mg/mL. Estudios previos de SDS-PAGE llevados a cabo por nuestro equipo de investigación, pusieron de manifiesto que la masa molecular aparente de la ebulina f es de 30.000 y 34.000 para las cadenas A y B respectivamente, y de 64.000 para la proteína nativa. El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de la proteína nativa reveló una masa molecular de 58.904 [Jiménez y cols., 2013]. Destacar que el procedimiento permite también el aislamiento de material proteico de Mr superior a 100.000 formado por ebulina-f polimerizada mediante enlaces disulfuro mezclada con lectina también polimerizada. Dichos enlaces disulfuro pueden ser reducidos con 2-mercaptoetanol. El procedimiento descrito, es muy largo y laborioso y cualquier error en el seguimiento del protocolo de cada una de las fases, afecta notablemente al rendimiento. Dado que la recolección de los frutos, hojas, umbelas, etc. sólo puede hacerse en unas fechas determinadas y que la capacidad de las columnas es limitada, el material biológico recién recolectado es mantenido congelado a -20°C hasta el momento de la extracción.

En la presente memoria, se ha tratado optimizar dicho proceso mediante el empleo de la liofilización, una operación básica farmacéutica. La liofilización es un sistema de desecación especial que consiste en la eliminación del agua contenida en un material mediante congelación y posterior sublimación del hielo formado. El producto resultante posee una humedad prácticamente nula y es fácilmente reconstituible cuando se le incorpora el agua eliminada. De hecho, ocupa el mismo volumen que el producto original, ya que lo que se hace es eliminar el agua sin afectar a la estructura. Todo esto confiere al producto una gran estabilidad, porque se evitan procesos hidrolíticos y se ralentiza la degradación por enzimas o microorganismos. Sin embargo, la obtención de la ebulina-f purificada únicamente se ha logrado obtener cuando se ha trabajado con frutos verdes congelados sin liofilizar. En el caso de los frutos verdes liofilizados no se ha podido diferenciar los picos de las dos proteínas mayoritarias por falta de resolución cromatográfica.

Analizando las dos preparaciones se observan diferencias a la hora de realizarlas que han podido ser las causantes de no poder conseguir la ebulina-f pura. Por un lado, la cantidad de frutos congelados de partida estandarizada y protocolizada por nuestro equipo de investigación es de 200 g. Sin embargo, en el caso de los frutos liofilizados se empleó una cantidad de 100 g. La cantidad de los frutos liofilizados a pesar de ser la mitad de la masa de frutos congelados es muy superior a ésta en cuanto a residuo seco neto, ya que durante el proceso de liofilización se perdió un porcentaje de masa acuosa del 80% del peso inicial. Por tanto para realizar correctamente el proceso de extracción con lo equivalente a los 200 g de fruto congelado se debería de haber empleado una cantidad de fruto liofilizado de 40 g. Otro aspecto importante es la pulverización de la masa vegetal para la primera extracción. La elaboración de la masa vegetal

previa al contacto con el buffer de extracción se ha realizado de forma diferente entre frutos frescos congelados y frutos liofilizados. En el caso de los frutos frescos congelados se ha procedido a una molturación de los mismos en medio de extracción mediante un mortero y un pistilo de porcelana. Sin embargo, con los frutos liofilizados se ha empleado un molinillo eléctrico obteniendo al final un polvo fino.

Debido a las diferencias en la cantidad y a la mayor superficie específica del material de partida, se ha producido una mayor extracción tanto de las proteínas como del resto de los elementos eluibles cuando se han empleado frutos liofilizados. Uno de los principales problemas del protocolo de extracción y purificación de las ebulinas, es la aparición en los extractos de un producto mucilaginoso, muy difícil de retirar y cuya presencia en el extracto provoca la obturación y el bloqueo de las columnas (Tejero 2012). Por tanto, es necesario optimizar en estudios posteriores estos factores, para poder reproducir el protocolo en frutos liofilizados de mucha mayor estabilidad.

Las RILs obtenidas de *S. ebulus* L. o *S. nigra* L. son consideradas como no tóxicas en relación a la ricina, la RIL dimérica más estudiada. De esta manera, se ha calculado que tras la administración intraperitoneal de ebulina-f, nigrina y ricina, la LD₅₀ IP es 2,5 12,0 y 0,023 mg/kg de peso corporal, respectivamente (Jiménez y cols. 2013a 2013b; Batelli y cols. 1997; He y cols. 2010).

La administración parenteral de dosis letales de ebulina-f provoca cambios histopatológicos en el estómago, los intestinos, los pulmones y el corazón (datos recientemente obtenidos por nuestro equipo de investigación en fase de publicación). La mucosa gástrica apenas se daña,

mostrando no más que una pérdida leve de mucocitos. La mucosa del intestino delgado sin embargo, aparece considerablemente afectada; las vellosidades son más cortas y menos numerosas, edematosas y desestructuradas, mientras las criptas de Lieberkühn se encuentran llenas de restos de células muertas y con las paredes atróficas. Se observa un aumento muy llamativo del número de apoptosis en los enterocitos que componen el TAC, lo que conduce a una disminución de la tasa de rotación y consecuentemente, a la desaparición de muchas criptas y vellosidades. La lámina propia también se daña, perdiendo su asociación normal con el epitelio. El colapso de esta barrera epitelial podría ser la causa de la aparición de las hemorragias graves que aparecen en el intestino delgado cuando se realizan las autopsias de estos animales. El intestino grueso también se altera, pero en menor medida, conservando las criptas de Lieberkühn su citoarquitectura general. La pérdida de células se produce principalmente en los enterocitos ya que las células caliciformes parecen ser más resistentes. Las células dañadas aparecen principalmente en el tercio medio de la cripta, el número de apoptosis observados en el intestino grueso es menor en comparación con el intestino delgado. Los pulmones aparecen congestivos y en algunos animales se aprecia hemorragia alveolar (datos no publicados). El músculo cardíaco aparece desestructurado, sin cohesión, con dehiscencia entre los cardiomiocitos (datos no publicados).

El objetivo principal de este trabajo experimental y bibliográfico consiste en evaluar la capacidad de la ebulina-f, una RIP obtenida de frutos verdes de *S. ebulus L.*, para generar un modelo de daño-regeneración intestinal de tipo enzimático similar al generado previamente con nigrina b, como consecuencia de la administración intraperitoneal de dosis subletales. Como dosis intraperitoneal subletal de ebulina-f se ha utilizado como

referencia la obtenida previamente por nuestro equipo de investigación de 2,5 mg/kg de peso corporal; sin embargo, en algunos estudios, como consecuencia de pequeñas variaciones experimentales en el protocolo de extracción y purificación de la proteína, ha sido necesario disminuir esta dosis a 2,2 mg/kg. En cualquier caso, la ebulina-f a dosis subletales produce un daño específico a nivel intestinal que hace que el animal, a pesar de tener acceso ilimitado a agua y comida apenas ingiera alimento, lo que se traduce en una alteración significativa de su masa corporal. Los resultados del presente estudio no difieren en gran medida respecto a los obtenidos por el grupo de investigación anteriormente.

Para determinar si la administración intraperitoneal de dosis subletales de ebulina-f en ratones, afecta a la permeabilidad vascular del epitelio intestinal, se administró un colorante, el azul de Evans vía intravenosa en animales tratados previamente. El azul de Evans (T-1824) es un colorante ampliamente empleado en estudios biofarmacéuticos para la determinación del volumen plasmático, por su avidez por las proteínas plasmáticas. Este estudio puso de manifiesto que la ebulina-f al igual que la nigrina-b, produce un aumento de permeabilidad vascular muy significativo a las 48 h de la administración IP de dosis subletales y que en el resto de tiempos evaluados, las diferencias no son significativas respecto al grupo control.

El daño intestinal se hace más evidente cuando se observan las heces que depositan los animales al ser tratados. Las heces evolucionan hacia la esteatorrea sanguinolenta con un incremento de la suciedad a nivel perianal. En el grupo de 48 horas se expulsan restos de estructuras intestinales internas de aspecto fibroso y graso, e incluso se observa como el colorante tiñe el contenido intestinal.

La adaptación de las mucosas es un proceso esencial en la homeostasis intestinal y se ve influenciada por estímulos hormonales, inmunológicos, dietéticos, nerviosos y mecánicos (Shaw y cols. 2012). La mucosa intestinal se adapta a una amplia gama de condiciones patológicas incluyendo la inanición, síndrome de intestino corto, la obesidad o la cirugía. De esta manera, diversos estudios han puesto de manifiesto que la atrofia de la mucosa se caracteriza por la disminución de la función intestinal, así como los cambios morfológicos incluyendo disminución de la altura de las vellosidades, profundidad de las criptas, área superficial, y el número de células epiteliales. La atrofia es más común en ausencia de nutrición enteral, y es una consecuencia a largo plazo conocida de hambre, un probable efecto que se reduce con la edad. Los estudios en animales sugieren un alivio gradual de la atrofia progresivamente con mayor consumo, y que la atrofia morfológica es más evidente en la punta de las vellosidades.

La evolución de los pesos y longitudes de los aparatos digestivos de los animales tratados con dosis subletales de ebulina-f demuestra que en los días donde se genera el mayor daño intestinal, el estómago presenta una tendencia no significativa al aumento de peso. Esta tendencia se debe al estado de éxtasis intestinal que induce una distensión anormal del estómago generando una hipertrofia del mismo. Sin embargo, el intestino delgado presenta una disminución muy acusada de los pesos a las 24 horas. Este punto es el de mayor daño a nivel de las vellosidades por la rotura de las mismas, aunque en el ensayo de azul de Evans se observe que la mayor permeabilidad vascular se alcance a las 48 horas. Este aumento a las 48 horas de la tinción de azul de Evans puede derivar de que los capilares están más dañados en ese momento a pesar de que a las 24 horas se genere el mayor daño intestinal. El colon permanece relativamente inalterado, ya

que aunque actúe la ebulina-f no tiene un número elevado de criptas y por tanto no se elimina tanta masa intestinal en el ataque.

Aunque no se ha estudiado en esta memoria, la actividad mieloperoxidasa se ha asociado a un incremento en la inflamación de los tejidos. A este respecto sería muy interesante llevar a cabo este estudio en las diferentes porciones del aparato intestinal estudiadas.

Para determinar si la administración IP de dosis subletales de ebulina-f es capaz de generar un modelo reversible de malabsorción oral útil en clínica para el desarrollo de fármacos en enfermedades que cursen con esta sintomatología, se ha evaluado desde un punto de vista biofarmacéutico y farmacocinético, cómo se modifica la absorción de vitamina C y de glucosa en animales tratados. Para ello en primer lugar se implantó una metodología analítica de linealidad, exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad adecuada (HPLC) para procesar muestras plasmáticas con dicha vitamina, y se adaptó en ratones, un método enzimático utilizado en la clínica en humanos para la determinación de niveles sanguíneos de glucosa.

La vitamina C o ácido ascórbico es un potente antioxidante empleado en formulaciones farmacéuticas en proporciones que oscilan entre 0,01 y 0,10 % p/V. Recientemente en nuestro equipo de investigación se ha puesto de manifiesto que la administración conjunta de dosis subletales de ebulina-f intraperitoneal y de Polyphenon E (una mezcla de polifenoles del té verde muy utilizada por su poder antioxidante) por vía oral, provoca una fuerte toxicidad responsable de la muerte del 60% de los ratones en 15 días provocándose una grave pérdida de la consistencia de los tejidos. Los polifenoles favorecen la sensibilización de las células del TAC al daño de

las RILs, probablemente debido al incremento de la secreción de citoquinas proinflamatorias y/o proapoptóticas.

La vitamina C se absorbe de manera diferente según se encuentre en su forma reducida u oxidada (Malo, C. y Wilson, J.X. 2000). Así el ácido ascórbico (forma reducida), se absorbe a nivel del tracto gastrointestinal fundamentalmente mediante un mecanismo de transporte activo con cotransporte de sodio descrito por primera vez por Crane en 1962 en la glucosa. El transporte de sodio a través de la membrana intestinal se divide en dos etapas. En una primera fase, el transporte activo de los iones sodio que cruza las membranas basolaterales de los enterocitos hacia el torrente circulatorio, provoca el descenso de la concentración intracelular del ión. Posteriormente, para mantener el tono osmótico intracelular, se produce un paso de sodio desde la luz intestinal al interior, mediante un proceso de difusión facilitada. Para que este proceso pueda llevarse a cabo, es necesario la unión de una molécula de ácido ascórbico a la proteína transportadora (SGLT1), de tal manera que la menor concentración intracelular de sodio, empuja al ión y al ácido ascórbico que lo acompaña al interior del enterocito. Desde ahí, es capaz de acceder al torrente circulatorio gracias a la ayuda del transportador GLUT2. Sin embargo, su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico, se absorbe por difusión facilitada, independiente de los transportadores de glucosa y a favor de gradiente.

El daño provocado por la administración IP de dosis subletales de ebulina-f, es probable que promueva la liberación de diversos radicales libres al lumen intestinal, de manera análoga a como sucede en diversas patologías como el cáncer, la colitis ulcerosa o la úlcera péptica, generando un ambiente altamente oxidante. Así, en animales no tratados con ebulina-f, existe un equilibrio entre la forma oxidada y la reducida de la vitamina que

hace que el mecanismo de absorción preponderante sea el de transporte activo y por tanto saturable a altas concentraciones. Sin embargo, en animales tratados el ambiente intestinal generado por el daño producido, haría que la mayoría de la vitamina se encontrará como ácido dehidroascórbico (DAA) y por tanto absorción se produzca por difusión facilitada. Dado que la absorción máxima se observa a las 72 h tras la administración de la ebulina-f es probable que los receptores que facilitan la difusión del DAA se localicen a nivel de las criptas de intestino delgado, ya que según los estudios histológicos llevados previamente por nuestro equipo de investigación, en ese momento las criptas del intestino delgado se encuentran casi recuperadas, mientras que la afectación de los villi y de las criptas de intestino grueso es considerable.

La glucosa se absorbe a nivel del tracto gastrointestinal fundamentalmente mediante un mecanismo de transporte activo con cotransporte de sodio SGLT1-GLUT2 de manera análoga a la vitamina C. Además del transporte de glucosa asociado a Na^+ , la glucosa entra a las células por los sistemas facilitadores del transporte de glucosa o GLUT. Estos transportadores se expresan en todos los tejidos del organismo, constituyendo el principal mecanismo de entrada de la glucosa a todas las células. Los GLUT transportan la glucosa a favor de su gradiente de concentración, de ahí el nombre de difusión facilitada. La entrada de la glucosa a las células epiteliales se realiza por los SGLT localizados en la membrana apical de cada célula. La glucosa sale de las células epiteliales por los sistemas facilitadores del transporte de glucosa localizados en la membrana basolateral (GLUT2). Por último destacar que si la concentración de glucosa en el lumen es lo suficientemente elevada, ésta se

puede absorber también por difusión pasiva. De esta manera, la glucosa se incorporaría al intersticio por ósmosis, arrastrada por el agua intestinal.

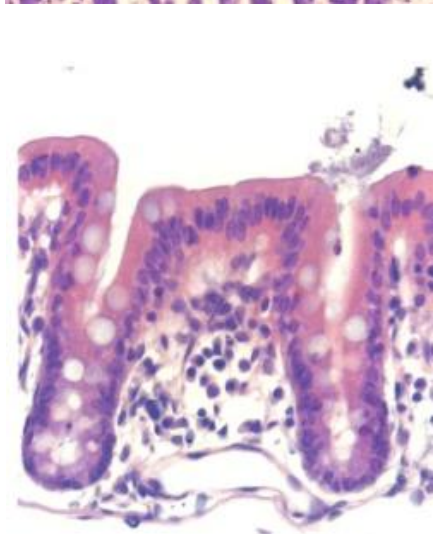
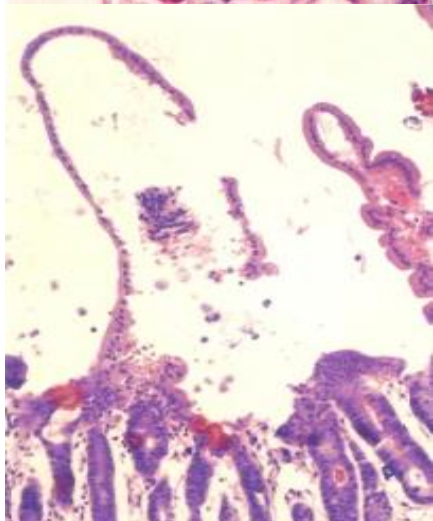
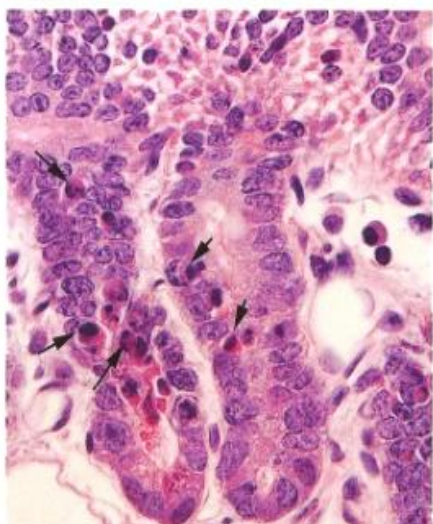
El daño intestinal generado como consecuencia de la administración IP de dosis subletales de ebulina-f, hace que la concentración plasmática de glucosa se reduzca notablemente y que no se recuperen los niveles basales tras el tiempo en el que según los estudios histológicos, el tejido se ha recuperado completamente.

Las criptas suponen una cuarta parte de la longitud de los villi intestinales. La diferenciación de los enterocitos de las criptas a los villi se asocia con una disminución notable en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, y un aumento en la expresión de genes relacionados con la digestión y la absorción de nutrientes. Así, la mayoría de transportadores implicados en procesos de absorción, se localizan en el tercio superior de los villi.

Las células epiteliales en el intestino delgado se someten a un programa de maduración regulada espacial y temporalmente a medida que migran a lo largo del eje cripta-vellosidad. Las células madre en la base de la cripta (ISCs) dan lugar a las células del TAC que posteriormente se diferencian en cualquiera de las células de la secretora (goblet, enteroendocrina o células de Paneth) o el linaje celular enterocítico. Los enterocitos, células caliciformes y enteroendocrinas se diferencian a medida que migran hacia el lumen intestinal a lo largo del eje cripta-vellosidad en un proceso que puede durar hasta diez días. Por su parte, los precursores de las células de Paneth migran hacia abajo, hacia la base de la cripta. Un proceso de renovación similar ocurre en el epitelio del colon con la excepción de que el colon está desprovista de células de Paneth y vellosidades. Los resultados obtenidos indican que a pesar de que los

tejidos intestinales aparezcan recuperados, la expresión de proteínas SGLT1-GLUT2 implicadas en el transporte de glucosa es todavía insuficiente. Estos receptores se localizan en el borde en cepillo de enterocitos adultos, aumentando su proporción seis veces desde la base al extremo luminal del villi, no existiendo en las criptas. Esto explica el hecho de que los niveles plasmáticos alcanzados sean muy similares en todos los tiempos evaluados.

6. CONCLUSIONES.



1. La extracción y purificación de ebulina-f a partir de frutos verdes congelados se ha llevado a cabo satisfactoriamente conforme el procedimiento descrito previamente por Citores y colaboradores 1998. Sin embargo, no ha sido posible resolver dicha RIL de la SELfd, una proteína con una doble unidad lectina y sin cadena enzimática de peso molecular muy similar, cuando los frutos han sido previamente liofilizados, por lo que sería necesario optimizar las fases previas al proceso de extracción.
2. La administración intraperitoneal de 2,2 mg/kg de peso de ebulina-f es una dosis suficiente para desarrollar el modelo de daño-regeneración en ratón con unas tasas de supervivencia próximas al 90%.
3. Como consecuencia de la administración intraperitoneal de dosis subletales de ebulina-f, aparece un aumento de la permeabilidad vascular a las 48 h de manera análoga al modelo de daño-regeneración inducido por nigrina b.
4. Debido al daño intestinal generado por la ebulina-f, los animales reducen notablemente la ingesta de alimento lo cual provoca una importante atrofia intestinal por ayuno. Este efecto es más acusado en el intestino delgado a las 24 h de la administración de la proteína. Los animales recuperan completamente todos los parámetros estudiados (peso y longitud de los tejidos) al final del estudio.
5. Se ha desarrollado y validado un método de cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de vitamina C en plasma exacto, lineal, preciso, robusto y específico y con unos límites de detección y cuantificación adecuados al estudio del analito en el modelo de daño-regeneración causado por dosis subletales de ebulina-f.
6. La administración de dosis orales de 100 mg/kg de vitamina C a los animales de experimentación evaluados, proporciona niveles

plasmáticos fácilmente cuantificables con la metodología analítica propuesta. La máxima concentración plasmática se observa a los 80 minutos de la administración. En ningún caso, se producen efectos tóxicos como consecuencia de la dosis de vitamina administrada.

7. La administración intraperitoneal de dosis IP subletales de ebulina-f produce un notable incremento en los niveles plasmáticos de vitamina C, que coincide temporalmente con el ambiente prooxidante generado en el lumen intestinal y con la regeneración de las criptas del intestino delgado. Las concentraciones de vitamina C tienden a recuperarse conforme se recupera el estado fisiológico del aparato digestivo.
8. El daño intestinal generado por la administración de dosis subletales de ebulina-f se recupera desde un punto de vista histológico a los nueve días. Los resultados de concentraciones plasmáticas de glucosa obtenidos sugieren sin embargo, que es probable que como consecuencia de la regeneración del tejido, disminuya la expresión de genes relacionados con la digestión y la absorción de nutrientes y que la aparición de enterocitos adultos y por tanto la funcionalidad completa del tejido necesite de más tiempo.

7. BIBLIOGRAFÍA.



Aceituno, M. y Panés, J. *Patogenia e inmunoterapia de la enfermedad inflamatoria intestinal: lecciones de los modelos animales. Gastroenterología y Hepatología.* 28 (9), 576-590. (2005).

Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe F. *Ribosome-inactivating proteins from plants. Biochim. Biophys. Acta.* 1154, 237-282. (1993).

Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., Stirpe, F. *Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly (A). Nucleic Acids Research.* 25, 518-522. (1997).

Battelli, M.G., Citores L, Buonamici L, Ferreras, J.M., de Benito, F., Stirpe F., Girbés T. *Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from Sambucus nigra: a comparison with ricin. Arch Toxicol.* 71, 360-364. (1997).

Battelli, M.G., Polito, L., Falà, F., Musiani, S., Tazzari, P.L., Stirpe, F., y Bolognesi, A. *Toxicity of xanthine oxidoreductase to malignant B lymphocytes. J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 19, 120-129. (2005).

Bénére, E., Geurden, T., Robertson, L., Van Assche, T., Cos, P., Maes, L. *Infectivity of Giardia duodenalis Assemblages A and E for the gerbil and axenisation of duodenal trophozoites. Parasitol. Int.* 59 (4), 634–637. (2010).

Benítez, J., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Arias, Y., Iglesias, R., Córdoba-Díaz, M., Del Villar, R., Girbés T. *Cytotoxicity of an ebulin l-anti-human CD105 immunotoxin on mouse fibroblasts (L929) and rat myoblasts (L6E9) cells expressing human CD105. Med. Chem.* 1, 65-70. (2005).

Botero, D. (a) *Parasitosis intestinales por pnematodos. EN: Botero, D. Parasitosis Humanas. Ed: 3ª. Editorial: Corporación para las investigaciones biológicas, Colombia, 1998. Pp: 105-115.*

Botero, D. (b) *Parasitosis intestinales por pnematodos. EN: Botero, D. Parasitosis Humanas. Ed: 3ª. Editorial: Corporación para las investigaciones biológicas, Colombia, 1998. Pp: 115-136.*

Botero, D. (c) *Otros protozoos intestinales*. EN: Botero, D. *Parasitosis Humanas*. Ed: 3ª. Editorial: Corporación para las investigaciones biológicas, Colombia, 1998. Pp: 61-67.

Botero, D. (d) *Trastornos intestinales por cestodos y trematodos*. EN: Botero, D. *Parasitosis Humanas*. Ed: 3ª. Editorial: Corporación para las investigaciones biológicas, Colombia, 1998. Pp:136-145.

Buhrmester, R.A., Ebinger, J.E., Seigler, D.S. *Sambunigrin and cyanogenic variability in populations of Sambucus Canadensis L. (Caprifoliaceae)*. *Biochem. Sys. Ecol.* 28, 689-695. (2000).

Bunnett, N., R. Lingappa, V. (a) *Enfermedad gastrointestinal*. EN: McPhee, Stephen J., Ganong, William F. *Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica*. Ed: 5ª. Editorial: Manual Moderno, Mexico, 2007. Pp: 359.

Bunnett, N., R. Lingappa, V. (b) *Enfermedad gastrointestinal*. EN: McPhee, Stephen J., Ganong, William F. *Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica*. Ed: 5ª. Editorial: Manual Moderno, Mexico, 2007. Pp: 357.

Bunnett, N., R. Lingappa, V. (C) *Enfermedad gastrointestinal*. EN: McPhee, Stephen J., Ganong, William, F. *Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica*. Ed: 5ª. Editorial: Manual Moderno, Mexico, 2007. Pp: 374-380.

Bürzle, M., Suzuki, Y., Ackermann, D., Miyazaki, H., Maeda, N., Cléménçon, B, Burrier, R., Hediger, M. *The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23*. *Mol. Aspects. Med.* 34, 436-454. (2013).

Casabó, V. G., Merino, M., Jiménez, N. V. *Factores fisiológicos en la absorción gastrointestinal (II)*. EN: Domenech, J., Martínez, J., Pla, J. M. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Editorial: Síntesis, Madrid, 1998. Pp: 163-189.

Castaño, Mª T., Ruiz, L., Vidal, J.L. *Monografías farmacéuticas*. Editorial: Colegio Oficial de Farmacéuticos de la provincia de Alicante, (1998).

Castrejón, V., Carbó, R., Martínez, M. *Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de glucosa*. *REB.* 26 (2), 49-57. (2007).

Citores, L., De Benito, F. M., Iglesias, R., Miguel, F. J., Argüeso, P., Jimenez, P., Méndez, E., Girbes, T. Presence of polymerized and free forms of the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein ebulin and a structurally related new homodimeric lectin in fruits of *Sambucus ebulus* L. *Planta*. 204, 310–319. (2013).

Citores, L., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Benítez, J., Jiménez, P; Girbés T. Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin L. *Cancer. Lett.* 184, 29-35. (2002).

Citores L., Ferreras, J.M., Iglesias, R., Carbajales, M.L., Arias, F.J., Jiménez, P., Rojo, M.A., Girbés, T. Molecular mechanism of inhibition of mammalian protein synthesis by some four-chain agglutinins. Proposal of an extended classification of plant ribosome-inactivating proteins (rRNA IV-glycosidases). *FEBS Lett.* 329, 59-62. (1993).

Citores L, Muñoz R, de Benito FM, Iglesias R, Ferreras JM, Girbés T., Differential sensitivity of HeLa cells to the type 2 ribosome-inactivating proteins ebulin l, nigrin b and nigrin f as compared with ricin. *Cell. Mol. Biol.* 42, 473-476. (1996).

Corrado, P.D., Bovi, R., Ciliento, L., Gaudio, A., Di Maro, S., Aceto, M., Lorito, R., Rao. Inducible expression of a *Phytolacca heterotepala* ribosome-inactivating protein leads to enhanced resistance against major fungal pathogens in tobacco. *Phytopathology*. 95 (2), 206–215. (2005).

Chang, J., Chance, MR., Nicholas, C., Ahmed, N., Guilmeau, S., Flandez, M., Wang, D., Byun, DS., Nasser, S., Albanese, J.M., Corner, G.A., Heerdt, B.G., Wilson, A.J., Augenlicht, L.H., Mariadason, J.M. Proteomic changes during intestinal cell maturation in vivo. *J Proteom* 71(5), 530-546, (2008).

Dahlhoff, M., Dames, P.M., Lechner, A., Herbach, N., Van Bürck, L., Wanke, R., Wolf, M.R., Schneider, E. Betacellulin overexpression in transgenic mice improves glucose tolerance and enhances insulin secretion by isolated islets in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 299 (2), 188-193. (2009).

De Benito, F.M., Cítores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Soriano, F. Ebulitins: A new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNAN-glycosidases) from leaves of

Sambucus ebulus L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1. *FEBS Lett.* 360(3), 299-302. (1995).

Dray, C., Sakar, Y., Vinel, C., Daviaud, D., Masri, B., Garrigues, L., Wanecq, E., Galvani, S., Negre-Salvayre, A., S. Barak, L., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., Valet, P., Castan-Laurell, I., Ducroc, R. The Intestinal Glucose-Apelin Cycle Controls Carbohydrate Absorption in Mice. *Gastroenterol.* 144 (4), 771-780. (2013).

Ebrahimzadeh MA, Mahmoudi M, Karami M, Saeedi S, Ahmadi AH, Salimi E. Separation of active and toxic portions in *Sambucus ebulus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 10(22):4171-4173. (2007).

Ebrahimzadeh, M.A., Mahmoudi, M., Salimi, E. Antiinflammatory activity of *Sambucus ebulus* L. hexane extracts. *Fitoterapia.* 77(2), 146-148). (2006).

Endo, Y., Tsurugi, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosome *Sambucus*. *J. Biol. Chem.* 262, 8128-8130. (1987).

Esteve, M.J., Farré R., Frigola, A., Garcia-Cantabella, J.M. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 688, 345-349. (1997).

Fando, J.L., Alaba, I., Escarmis, C., Fernandez-Luna, J.L., Mendez, E., Salinas, M. The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. *Eur J Biochem.* 149, 29-34. (1985).

Fracasso, G., Stirpe, F., Colombatti, M. Ribosome-inactivating protein-containing conjugates for therapeutic use. EN: Lord, J.M., Hartley, M.R. (Eds.), *Toxic Plant Proteins. Plant Cell Monographs.* Editorial: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Berlín, 2010, Pp: 225–263.

Folkman, J. Cáncer y suministro sanguíneo. *Investigación y Ciencia.* 242. (1996).

Gayoso, M. J., Muñoz, R. ; Arias Y., Villar, R., Rojo, M.A., Jiménez, P., Ferreras, J.M., Aranguez, I; Girbés, T. Specific dose-dependent damage of Lieberkühn crypts promoted

by large doses of type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b intravenous injection to mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 207, 138–146. (2005).

Girbés T., Córdoba-Díaz, D. Jiménez, P, (2009) Tesis Doctoral. Capacidad antioxidante y antirradicalaria, y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del saúco enano (Sambucus ebulus L.).

Girbés, T., De Torre, C., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Méndez, E. RIP for viruses. Nature. 379, 777-778. (1996).

Girbés, T., Citores, L., Ferreras, J.M., Rojo, M.A., Iglesias, R., Muñoz, R., Arias, F.J., Calonge, M., García, J.R., Méndez, E.(a) Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of Sambucus nigra L. Plant. Mol. Biol. 22, 1181-1186. (1993).

Girbés, T., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Rojo, M.A., Arias, F.J., García, J.R., Méndez, E., Calonge, M. (b) Ebulin l, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from Sambucus ebulus L. leaves. J Biol Chem. 268, 18195-18199. (1993).

Girbés, T., Ferreras, J.M., Arias, F.J. ; Muñoz, R., Iglesias, R., Jiménez, P., Rojo, M.A., Arias, Y., Pérez, Y., Benítez, J., Sánchez, D., Gayoso, M.J. Non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins (RIPs) from Sambucus: occurrence, cellular and molecular activities and potential uses. Cell. Mol. Biol. 49, 537 – 545. (2003).

Girbés, T., Ferreras, J.M., Arias, F.J., Stirpe, F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. Mini-Rev Med Chem. 4, 461-476. (2004).

Gobierno de España; Ministerio de la Presidencia. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Boletín Oficial del Estado número 34, sección I, Páginas 11370 a 11421. Viernes 8 de Febrero de 2013.

Guyton, A. C. y Hall, J. E. (a) *Digestión y absorción en el tubo digestivo*. EN: Guyton, A. C., Hall John E. *Text book of Medical Physiology*. Ed: 11ª. Editorial: Elsevier Saunders, China, 2006. Pp. 812-822.

Hanahan, D., Folkman, J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. *CelL*. 80, 353-64. (1996).

Hernández-Sánchez, J., Fonseca Liñán, R., Salinas-Tabón; Mª. Rº; Ortega-Pierres G. *Giardia duodenalis: Adhesion-deficient clones have reduced ability to establish infection in Mongolian gerbils*. *Exp. Parasitol*. 119 (3), 364–372. (2008).

Herrero, N., Cordoba-Diaz, M., Cordoba-Diaz, D. *Desarrollo y validación de un método de análisis de vitamina C por HPLC*. Trabajo de fin de Máster Farmacia y Tecnología Farmacéutica. (2013).

Jensen, S.R., Nielsen, B.J. *Cyanogenic glucosides in Sambucus nigra L*. *Acta. Chem. Scand*. 27, 2661-2662. (1973).

Jiménez, N. V., Pla Delfina, J.Mª., Villaverde, A. *Factores fisiológicos en la absorción gastrointestinal (I)*. EN: Domenech, J., Martínez, J., Pla, J. M. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Editorial: Síntesis, Madrid, 1998. Pp: 145-161.

Jiménez P., Cordoba-Diaz D., Cabrero P., Aracil M., J. Gayoso M., Garrosa M., Cordoba-Diaz M., Girbés T. *Plasma accumulations of vitamin B6 from an oral dose in a new reversible model for mouse gut injury and regeneration*. *Food. Nutr. Sci*. 4, 908-917. (2013a).

Jiménez, P., Gayoso, M., Tejero, J., Cabrero, P., Córdoba-Díaz, D., E. Basterrechea, J., Girbés, T. *Toxicity in mice of lectin ebulin f present in dwarf Elderberry (Sambucus ebulus L.)*. *Toxicon*. 61, 26–29. (2013b).

Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M. *Ribosome Biogenesis and the Translation Process in Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71, 477-494. (2007)

Kellett, G. L., Brot-Laroche, E., Mace, O. J., Leturque, A. *Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2*. *Annu. Rev. Nutr*. 28, 35-54. (2008).

Kim, T. H., Petrou, S., Reid, C. A. (2014). Low glycaemic index diet reduces seizure susceptibility in a syndrome-specific mouse model of generalized epilepsy. *Epilepsy Res.* 108, 139-143. (2014).

Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother Res.* (11), 961-965. (2006).

Korman, M.G., Bolin, T.D., Engelmann, J.I., Pianko S. Sucralfate as an alternative to bismuth in quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter.* 2, 140-143. (1997).

López-Otín, C., Barber, D., Fernández-Luna, J.L., Soriano, F., Méndez, E. The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *Eur J Biochem.* 143, 621-634. (1984).

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (a): Tratamiento de aguas residuales, potabilización de las aguas y enfermedades microbianas transmitidas por el agua. EN: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. *Brock Biología de los Microorganismos.* Ed: 10ª. Editorial: Pearson, Madrid, 2003. Pp: 935-936.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (b): Enfermedades microbianas transmitidas de persona a persona. EN: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. *Brock Biología de los Microorganismos.* Ed: 10ª. Editorial: Pearson, Madrid, 2003. Pp: 874-877.

Malo, C., Wilson, J.X. Glucose Modulates Vitamin C Transport in Adult Human Small Intestinal Brush Border Membrane Vesicles. *J. Nutr.* 130, 63-69. (2000).

Mañé, J. Revisión: Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutr. Hosp.* 22 (2), 178-89. (2007).

Martin, L., Jacomet, S., Thiebault, S. Plant economy during the Neolithic in a mountain context: the case of ‘Le Chenet des Pierres’ in the French Alps (Bozel-Savoie, France). *Veget Hist Archaeobot.* 17 (Suppl 1), S113–S122. (2008).

Morlon-Guyot, J., Helmy, M., Lombard-Frasca, S., Pignol, D., Piéroni, G., Beaumelle, B. Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *J Biol Chem.* 278, 17006-17011. (2003).

Muñoz, R., Arias, Y., Ferreras, J.M., Rojo, A., Jiménez, P., Girbés, T. Sensitivity of several cancer cell lines to ricin and the novel type 2 ribosome- inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett.* 167, 163-169. (2001).

Muñoz, R., Arias, Y., Ferreras, J.M., Jiménez, P., Langa, C., Rojo, M.A., Gayoso, M.J., Córdoba-Díaz, D., Bernabéu, C., Girbés, T. In vitro and in vivo effects of an anti-mouse endoglin (CD105)-immunotoxin on the early stages of mouse B16MEL4A5 melanoma tumours. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 541-51. (2013).

Nelson, D., M. Cox, M. Glucólisis y catabolismo de las hexosas. EN: *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Ed. 3°. Editorial: Ediciones omega, España, 2001. Pp 550-551.

Nielsen, K., Boston, R. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52, 785-816. (2001).

Ogawa, Y., Kanatsu, K., Iino, T., Jeong, Y., Shibata, N., Takada, K., Takeuchi, K. Protection against dextran sulfate sodium-induced colitis by microspheres of ellagic acid in rats. *Life Sci.* 71 (7), 827-839. (2002).

Pascal, J.M., Day, P.J., Monzingo, A.F., Ernst S.R., Robertus, J.D., Iglesias, R., Pérez, Y., Ferreras, J.M., Citores, L., Girbés, T. 2.8-A crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin L. *Proteins.* 43, 319-326. (2001).

Penhoat, A., Fayard, L., Stefanutti, A., Mithieux, G., Rajas, F. Intestinal gluconeogenesis is crucial to maintain a physiological fasting glycemia in the absence of hepatic glucose production in mice. *Metabolism.* 63, 104-111. (2014).

Peumans, W.J., Van Damme, E.J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109(2), 347-52. (1995).

Pribela, A., Durcanska, J., Piry, J., Karovicova, J. Volatile substances of dwarf elder *Sambucus ebulus* L. fruits. *Biología. (Bratislava)* 47(3), 225-230. (1992).

Puri M., Kaur I., Perugini M. A., Gupta, R. C. Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug. Discov. Today*. 17 (13-14), 774-783. (2012).

Rottoli, M., Castiglioni, E. Prehistory of plant growing and collecting in northern Italy, based on seed remains from the early Neolithic and Chalcolithic (c.5600-2100 cal BC). *Vegetation History and Archaeobotany*. 18, 91-103. (2009).

Rivas, C.I., Zúñiga, F.A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., Vera, J.C. Vitamin C transporters. *J. Physiol. Biochem*. 64,357-376. (2008).

Rojo, M.A., Citores, L., Arias, F.J., Ferreras, J.M., Jiménez, P., Girbés, T. Molecular cloning of a cDNA coding for the D-galactose-binding dimeric lectin of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) leaves. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 35, 1061-1065. (2003).

Saeedi Saravi, S.S., Shokrzadeh, M. Anti-inflammatory, toxic effects, biochemical and pathological analysis in presence or lack of vitamins C and E, and cytotoxicity of n-hexane, methanolic and ethyl acetate extracts of *Sambucus ebulus*. *Toxicol. Lett*. 189S, 166-167. (2009a).

Saeedi Saravi, S.S., Shokrzadeh M. Histopathological and Biochemical Disorders Following Administration of *Sambucus ebulus* L. Extract on Mice and Rats and Preventive Effects of Vitamins C and E on Renal and Hepatic Disorders. *Phcog. Mag*. 5, 131-135. (2009b).

Sánchez-Mata, M.C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., Torija-Isasa, M.E. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans. *Eur. Food Res. Technol*. 210, 220-225. (2000)

Sayer, A.M., Gayle Littlefield, L; J. DuFrain, R., B. Richter, C. Analysis of Mutagen-induced Chromosome Damage in a Primate Species (*Saguinus oedipus oedipus*) at Risk for Spontaneous Adenocarcinoma of the Colon. *Cancer Genet. Cytogenet*. 3(2), 161–169. (1981).

Shaw, D., Gohil, K., Basson, M.D. Intestinal mucosal atrophy and adaptation. *World J Gastroenterol*. 18(44), 6357-6375 (1981).

Stirpe, F., Battelli, M.G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63, 1850-1866. (2006).

Stirpe, F. Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon.* 67, 12-16. (2013).

Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yalçın, F.N., Koca, U., Keleş, H., Yesilada, E. Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *J Ethnopharmacol.* 4,129 (1):106-14. (2010).

Suzuki, T., Mochizuki, K., Goda, T. Localized expression of genes related to carbohydrate and lipid absorption along the crypt-villus axis of rat jejunum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790(12), 1624-1635 (2009).

Svinth, M., Steinghardt, J., Hernandez, R., Duh, J.K., Kelly, C., Day, P., Lord, M., Girbés, T., Robertus, J.D. Differences in cytotoxicity of native and engineered RIPs can be used to assess their ability to reach the cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 637-642. (1998).

Sweetman, S. C. *Nutritional Agents and Vitamins*. EN: Sweetman, Sean C. Martindale. Ed: 36ª, Editorial: Pharmaceutical Press, China, 2009. Pp: 1983-1985.

Takanaga, H., Mackenzie, B., Hediger, M. Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Eur. J. Physiol.* 447, 677-682. (2004).

Tortora, G. J. y Derrickson, B. (a) *El aparato digestivo y la homeostasis*. EN: Tortora, G. J. y Derrickson, B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Ed: 11ª. Editorial Medica Panamericana, Madrid, 2006. Pp: 909-910.

Tortora, G. J. y Derrickson, B. (b) *El aparato digestivo y la homeostasis*. EN: Tortora, G. J. y Derrickson, B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Ed: 11ª. Editorial Medica Panamericana, Madrid, 2006. Pp: 919-921.

Tortora, G. J. y Derrickson, B. (c) *El aparato digestivo y la homeostasis*. EN: Tortora, G. J. y Derrickson, B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Ed: 11ª. Editorial Medica Panamericana, Madrid, 2006. Pp: 927-933.

Triola, M. *Correlación y regresión*. EN: Triola, M. *Estadística*. Ed: 9ª. Editorial: Pearson, México, 2004. Pp: 494-551.

Veslemøy, G., Hartmann. C., Ravn, M., Nielsen, D.S., Aasted, B., Vogensen, F., Midtvedt, T., Hansen, A. *Manipulation of the gut microbiota in C57BL/6 mice changes glucose tolerance without affecting weight development and gut mucosal immunity*. *Res. Vet. Sci.* 92 (3), 501-508. (2012).

Wilson, D.N., Nierhaus, K.H. *The E-site story: the importance of maintaining two tRNAs on the ribosome during protein synthesis*. *Cellular and Molecular Life Science*. 63, 2725-37. (2006).

Young, E., Lee, H., Jung, H., Kim, J., Lee, K., Suh, H., *Feeding silk protein hydrolysates to C57BL/KsJ-db/db mice improves blood glucose and lipid profiles*. *Nutr. Res.* 30 (11), 783-790. (2010).

Yesilada E. *Evaluation of the anti-inflammatory activity of the Turkish medicinal plant Sambucus ebulus*. *Chem. Nat. Comp.* 33(5), 539-540. (1995).

Yesilada, E., Gurbuz, I., Shibata, H. *Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-Helicobacter pylori activity*. *J. Ethnopharmacol.* 66, 289-293. (1999).

Youngman, E.M., Green, R. *Ribosomal translocation: LepA does it backwards*. *Curr Biol.* 17R, 136-139. (2007).

8. RESUMEN (ABSTRACT)



Title: GALENICAL APPLICATION OF THE REVERSIBLE EXPERIMENTAL MODEL OF ORAL MALABSORPTION SYNDROME PROVOKED BY EBULIN-f

8.1. INTRODUCTION

Malabsorption syndromes refers to a number of disorders in which the small intestine's ability to absorb nutrients or drugs into the bloodstream is negatively affected. These disorders can be triggered by different circumstances and caused by many factors such as the continuous oral administration of antibiotics, celiac disease or inflammatory processes, like Crohn's disease or inflammatory bowel disease what can affect different areas of the digestive tract, among others.

Some animal models have been proposed in the last few years to investigate how the malabsorption syndrome can affect the oral bioavailability of nutrients or drugs. In general lines, these models can be classified into two categories: spontaneous models and induced models. Spontaneous models are usually very expensive and difficult to use because of the restrictions in the use of certain species. Meanwhile, several induced models have been proposed, like the rectal administration of potent irritating and oxidizing agents including acetic acid, trinitrobenzenesulfonic acid or oxazolone, or the oral administration of different substances like NSAID's, carrageenan or sodium dextran. Another option constitutes the use of genetically-modified animals like those showing deficiencies of different interleukins or some specific transgenic mice like CH3/HeJBlr or SAMP/Ylt. These models are also very expensive and irreversible. As an alternative to this traditional models, it has been previously reported that parenteral administration of non-toxic RIPs like ebulins, isolated from *Sambucus ebulus* L. or nigrins, isolated from *S. nigra* L. at sublethal dose,

provoked reversible damage on the gastrointestinal tract, firstly, the small intestine, and afterwards the large intestine. Under such conditions, these RIPs promote intestinal stem cell apoptosis or/and the proliferation progenitors present in crypts. It is specially remarkable the fact that this model of intestinal damage is reversible and repetitive, constituting a promising alternative to study, not only how malabsorption syndromes can affect the pharmacokinetic properties of different nutrients or drugs but also the regeneration processes leading to gut recovery.

8.2. OBJECTIVE

The main aim of the present work is focused in the elucidation of the ability of ebulin-f, a RIP isolated from fresh fruits of *S. ebulus L.*, to generate a damage-regeneration intestinal model in Swiss CD1 mice.

In order to study the animal model obtained by the administration of sublethal doses of this RIP, the absorption and other pharmacokinetic parameters of different substances will be determined in a group of mice selected as control, and other groups in which ebulin-f was previously administered in different times. Vitamin C and glucose as orally administered as markers.

8.3. RESULTS AND DISCUSSION

An implementation and a optimization of a protocol for the extraction and isolation of ebulin-f form *S. ebulus L.* green fruits was carried out. It was found that the yield in the extraction and isolation process was dramatically higher for fresh frozen fruits in comparison to those results obtained from lyophilized fruits. Nevertheless, it was observed that the total amount of proteins and other elutable compounds recovered was higher for the lyophilised species, exhibiting a larger surface area by far

in comparison to the simply frozen material. This suggests that further studies should be made to optimize the lyophilisation of this kind of samples.

It was found that the intraperitoneal administration of sublethal doses of ebulin-f provoked a specific damage to the intestine of the monitored animals. Intravenous administration of Evans Blue (T-1824) to mice previously treated with ebulin-f revealed that vascular permeability increased dramatically as a consequence of the disorder provoked by this protein 48 hours after its administration. It was also observed that the vascular permeability appeared to be similar to the observed in the group without ebulin (control) for the mice pre-treated with ebulin at other different times. These facts evidenced that damage visible at 48 hours and further regeneration was taking place.

The area under the curve of the plot serum concentration vs. time (AUC values) for vitamin C and glucose with a control group of animals (without ebulin) and with mice pre-treated with ebulin revealed different behaviours in terms of damage-regeneration.

Taking into consideration that the absorption mechanisms of vitamin C is different comparing ascorbic with dehydroascorbic acid, these results suggested that the treatment with ebulin-f, not only provokes a tissular damage but also can provoke a oxidizing environment similar to the resulting with some pathologies like cancer or Crohn Disease. It can be also observed that the differences between untreated mice and those pre-treated with ebulin-f are less evident with glucose. This is because the absorption of glucose is mediated with specific receptors that can be damaged by the action of ebulin-f but this effect is partially avoided by the absorption by passive diffusion.

8.4. CONCLUSIONS

1. Extraction and purification of ebulin-f from frozen green fruits was successfully carried out following the previously described protocol (Citores and co-workers, 1998). Nevertheless, it was not possible to isolate the above-mentioned RIL form SELfd, a protein with a double lectin unit and without a enzymatic chain showing a molecular weight very similar, when the fruits were previously lyophilized. This is the reason why the previous steps to the extraction should be optimized.

2. It was demonstrated that 2.2 mg of ebulin-f per kilogram of body weight administered intraperitoneally, constitutes an optimum dose to get the damage-regeneration model in mice obtaining survival ratios near 90%.

3. It was observed a significant increase of the vascular permeability 48 h after the intraperitoneal administration of sub-lethal doses of ebulin-f, in the same way that the symptoms found with the damage-regeneration model induced by nigrin-b.

4. It was found that the animals reduced dramatically the food ingestion due to the damage provoked by ebulin-f, what leaded to a significant intestinal atrophy caused by fasting. This effect was found to be more drastic in the small intestine at 24 hours after the administration of the protein. At the end of the study, all the animals recovered totally the original values of the monitored parameters (weight and tissue – length).

5. An HPLC method for the determination of vitamin C concentrations in plasma was implemented and validated. The method showed good linearity, precision, accuracy and robustness. Limits of detection and quantification obtained were found to be adequate for the

assay of the mentioned analyte in the context of the study of the damage-regeneration model provoked by sub lethal doses of ebulin-f.

6. It was found that serum levels of vitamin C in the monitored mice prior the oral administration of doses of 100 mg/kg reached values higher than the quantification limits and in the range of demonstrated linearity for our proposed analytical method. Maximum serum concentration was reached at 80 min from the oral administration. No toxic effects were found in any case.

7. Intraperitoneal administration of sub lethal doses of ebulin-f provoked a remarkable increase of the vitamin C serum levels. This fact overlap in time with the pro-oxidant environment generated in the intestinal lumen and with the regeneration of the crypts in the small intestine. It was demonstrated that vitamin C serum levels tended to reach the basal levels as the digestive tract is being recovered from the damage caused by ebulin-f.

8. From the results obtained in the histological studies, we are able to conclude that the intestinal tissular structures recovered from the damage provoked by the intraperitoneal administration of sub lethal doses of ebulin-f. Nevertheless, the analysis of the serum levels obtained with glucose suggested that the expression of those genes related to digestive processes and absorption of nutrients is decreased at the maximum time observed in our studies. In this way, the production of mature enterocytes and subsequently the whole tissular regeneration needs a longer period of time.

